

**UNTERSUCHUNGEN ZUM
TOXIKOLOGISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS
VON MIMOSIN**

HELMUT SCHMID

1988

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

UNTERSUCHUNGEN ZUM TOXIKOLOGISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS

VON MIMOSIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Helmut Schmid

aus

München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. R. Schulz

Korreferent: Prof. Dr. H. P. Jennissen

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1. Einleitung	1
2. Zusammenfassung	2
3. Zielsetzung	3
4. Methodik	4
5. Ergebnisse	5
6. Diskussion	6
7. Schlussfolgerungen	7
8. Literaturverzeichnis	8
9. Anhang	9
10. Bibliographie	10
11. Zusammenfassung	11
12. Zielsetzung	12
13. Methodik	13
14. Ergebnisse	14
15. Diskussion	15
16. Schlussfolgerungen	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Anhang	18
19. Bibliographie	19
20. Zusammenfassung	20
21. Zielsetzung	21
22. Methodik	22
23. Ergebnisse	23
24. Diskussion	24
25. Schlussfolgerungen	25
26. Literaturverzeichnis	26
27. Anhang	27
28. Bibliographie	28
29. Zusammenfassung	29
30. Zielsetzung	30
31. Methodik	31
32. Ergebnisse	32
33. Diskussion	33
34. Schlussfolgerungen	34
35. Literaturverzeichnis	35
36. Anhang	36
37. Bibliographie	37
38. Zusammenfassung	38
39. Zielsetzung	39
40. Methodik	40
41. Ergebnisse	41
42. Diskussion	42
43. Schlussfolgerungen	43
44. Literaturverzeichnis	44
45. Anhang	45
46. Bibliographie	46
47. Zusammenfassung	47
48. Zielsetzung	48
49. Methodik	49
50. Ergebnisse	50
51. Diskussion	51
52. Schlussfolgerungen	52
53. Literaturverzeichnis	53
54. Anhang	54
55. Bibliographie	55
56. Zusammenfassung	56
57. Zielsetzung	57
58. Methodik	58
59. Ergebnisse	59
60. Diskussion	60
61. Schlussfolgerungen	61
62. Literaturverzeichnis	62
63. Anhang	63
64. Bibliographie	64
65. Zusammenfassung	65
66. Zielsetzung	66
67. Methodik	67
68. Ergebnisse	68
69. Diskussion	69
70. Schlussfolgerungen	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Anhang	72
73. Bibliographie	73
74. Zusammenfassung	74
75. Zielsetzung	75
76. Methodik	76
77. Ergebnisse	77
78. Diskussion	78
79. Schlussfolgerungen	79
80. Literaturverzeichnis	80
81. Anhang	81
82. Bibliographie	82
83. Zusammenfassung	83
84. Zielsetzung	84
85. Methodik	85
86. Ergebnisse	86
87. Diskussion	87
88. Schlussfolgerungen	88
89. Literaturverzeichnis	89
90. Anhang	90
91. Bibliographie	91
92. Zusammenfassung	92
93. Zielsetzung	93
94. Methodik	94
95. Ergebnisse	95
96. Diskussion	96
97. Schlussfolgerungen	97
98. Literaturverzeichnis	98
99. Anhang	99
100. Bibliographie	100

Meinen Eltern
und
meiner verstorbenen Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I <u>EINLEITUNG</u>	1
II <u>LITERATUR</u>	3
1 <u>Vorkommen</u>	3
2 <u>Chemie</u>	5
3 <u>Stoffwechsel</u>	7
3.1 Resorption	7
3.2 Endogene Verteilung	8
3.3 Metabolisierung	8
3.4 Ausscheidung	10
3.5 Rückstandsbildung	11
4 <u>Toxizität</u>	12
4.1 Leucaena leucocephala	12
4.2 Mimosin	12
4.2.1 Akute und subakute Toxizität	12
4.2.2 Subchronische und chronische Toxizität	13
4.3 Mimosinmetaboliten	14
5 <u>Vergiftungsbild</u>	15
5.1 Vergiftungsbild beim Wiederkäuer	15
5.1.1 Orale Aufnahme	15
5.1.2 Abomasale Applikation	16
5.1.3 Intravenöse Applikation	17
5.2 Vergiftungsbild beim Schwein	17
5.3 Vergiftungsbild beim Pferd	17
5.4 Vergiftungsbild beim Kaninchen	17
5.5 Vergiftungsbild beim Geflügel	17
5.6 Vergiftungsbild bei Labortieren	18
6 <u>Therapie</u>	19
7 <u>Prophylaxe</u>	20
8 <u>Wirkungsmechanismus</u>	21
8.1 Mimosin	21
8.2 Mimosinmetaboliten	24
9 <u>Hypothesen zum Wirkungsmechanismus</u>	24
9.1 Oxidative Schädigung in vivo	25
9.2 Verarmung an essentiellen Spurenelementen	27

	Seite
III <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	29
1 <u>Vorbemerkung</u>	29
2 <u>Wirksamkeitsprüfung von Mimosin</u>	29
2.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung	29
2.2 Mimosin, Mimosinapplikation	33
2.3 Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung	33
3 <u>Untersuchung von Mimosin auf oxidierende Eigenschaften in vivo</u>	35
3.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung	35
3.2 Gase, Chemikalien und Lösungen bzw. Suspensionen	37
3.3 Bestimmung der Kohlenwasserstoffexspiration	39
3.3.1 Versuchsdurchführung	39
3.3.2 Ergebnisse der Expirationsuntersuchungen	42
3.4 Glutathionbestimmung in der Leber	45
3.4.1 Versuchsdurchführung	45
3.4.2 Ergebnisse der Glutathionbestimmungen	48
3.5 Schlußfolgerungen	50
4 <u>Untersuchung von Mimosin auf chelatbildende Eigenschaften</u>	50
4.1 Untersuchungen in vitro	51
4.1.1 Mimosin-Schwermetallspektren	51
4.1.2 Mimosin-Schwermetallchelate	56
4.2 Untersuchungen in vivo	61
4.2.1 Versuchstiere	61
4.2.2 Versuchsdurchführung	61
4.2.3 Renale Eisenausscheidung	62
4.2.4 Renale Zinkausscheidung	64
4.2.5 Renale Cupferausscheidung	66
4.3 Schlußfolgerungen	67
IV <u>DISKUSSION</u>	68
V <u>ZUSAMMENFASSUNG, SUMMARY</u>	77
VI <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	81

I EINLEITUNG

Mimosin ist ein toxischer Pflanzeninhaltsstoff, welcher in Mimosengewächsen der Genera *Leucaena* und *Mimosa* vorkommt (Anderson und Fowden 1970; Thompson et al 1969; Windholz et al 1983). Die praktisch wichtigste Pflanzenspecies ist *Leucaena leucocephala*, weil sie u. a. als Futterpflanze für Rinder, Schafe und andere Nutztierarten Verwendung findet (ter Meulen und El-Harith 1985) sowie der menschlichen Ernährung dient (Lindner 1986).

Die unlimitierte Verfütterung mimosinhaltiger Pflanzen führt zu Vergiftungen, die - obwohl tierartlich verschieden - u. a. durch Haarausfall, hämorrhagische Enteritis, Wachstumshemmung bzw. Abnahme des Körpergewichtes und Fortpflanzungsstörungen gekennzeichnet sind (Clarke et al 1981; Szyszka und ter Meulen 1984b; ter Meulen und El-Harith 1985).

Die Pathogenese der Mimosinvergiftung ist trotz zahlreicher Untersuchungen bislang ungeklärt (Szyszka und ter Meulen 1984c und 1984d). Diskutiert wird eine Störung des Proteinstoffwechsels (El-Harith et al 1983; Hegarty 1978), die Bildung atypischer Gallensalze (El-Harith et al 1983), eine Hemmung der Biosynthese von Nucleinsäuren (El-Harith et al 1983; Reisner et al 1979), die Inaktivierung von Pyridoxalphosphat (El-Harith et al 1983; Thompson et al 1969) und eine Hemmung schwermetallhaltiger Enzyme (El-Harith et al 1983; Thompson et al 1969). Die Heterogenität der Vorschläge entspricht dem komplexen Vergiftungsbild von Mimosin.

Keine dieser Hypothesen vermag das Zustandekommen der Mimosinvergiftung befriedigend zu erklären (Szyszka und ter Meulen 1984c und 1984d). Infolgedessen sind weitere Untersuchungen über den molekularen Wirkungsmechanismus von Mimosin wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit werden solche Untersuchungen beschrieben. Sie erstrecken sich zunächst auf die Frage, ob die toxischen Wirkungen des Mimosins auf einer Lipidperoxidation beruhen, da das Molekül eine semichinonartige Teilstruktur enthält (s. II 2 Chemie) und deshalb oxidierende Eigenschaften haben könnte. Dazu kommt eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe mit der Möglichkeit eines erhöhten Verbrauches körpereigener Reduktionsäquivalente durch Bindung von Glutathion (Beuter et al 1985).

Gegenstand weiterer Untersuchungen sind die möglichen chelatbildenden Eigenschaften von Mimosin mit Schwermetallen, deren toxikologisch wichtigste Konsequenz eine erhöhte renale Ausscheidung metallischer Spurenelemente sein könnte. Die Untersuchungen werden nahe gelegt durch die in der Literatur berichtete protektive Wirkung von Eisen(II)sulfat und anderen Mineralsalzen bei der Mimosinvergiftung (Jones et al 1978; Matsumoto et al 1951).

II LITERATUR

Im folgenden wird zunächst der gegenwärtige Wissensstand zu den bearbeiteten Problemen anhand der Literatur berichtet.

1 Vorkommen

Mimosin kommt in Blättern und Samen von Mimosengewächsen vor (Windholz et al 1983). Die Mimosengewächse sind eine in den Tropen und Subtropen beheimatete Pflanzenfamilie (Mimosaceae) aus der Ordnung der Hülsenfrüchtler (Leguminosen; Fabales, Leguminosae), welcher auch die Familien Schmetterlingsblütler (Fabaceae, Papilionaceae) und Caesalpiniengewächse (Caesalpiniaceae) angehören (Frohne und Jensen 1979). Es handelt sich um krautige oder holzige Pflanzen mit gefiederten Blättern und hülseförmigen, meist vielsamigen Früchten.

Unter den Mimosengewächsen findet sich Mimosin bei den Genera *Mimosa* und *Leucaena* (Windholz et al 1983), von welchen die Species *Mimosa pudica* und *Leucaena leucocephala* die höchsten Gehalte aufweisen und damit die größte toxikologische Bedeutung haben (Clarke et al 1981; Hegarty 1978).

Mimosa pudica ist ein pantropisches Unkraut (Frohne und Jensen 1979).

Leucaena leucocephala stammt aus Zentralamerika und kommt nun in tropischen und subtropischen Gebieten ubiquitär vor (ter Meulen und El-Harith 1983). Es handelt sich um eine immergrüne Holzpflanze mit gefiederten Blättern und Hülsenfrüchten (Frohne und Jensen 1979; Szyszka und ter Meulen 1985), deren Wachstumsgeschwindigkeit vier bis sechs Meter pro Jahr beträgt (ter Meulen und El-Harith 1983). Die Pflanze zeichnet sich durch geringe Ansprüche an die Bodenbeschaffenheit und große Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit aus (Clarke et al 1981). Diese Eigenschaften sind wichtige Gründe für ihre weite Verbreitung. Dazu kommt ihre vielfältige Nutzbarkeit. *Leucaena leucocephala* findet Verwendung - als Bau- und Brennmaterial (ter Meulen und El-Harith 1983),



- zur Bodenmelioration und Erosionsverhütung (Szyszka et al 1985; ter Meulen und El-Harith 1983),
- als Schattenpflanze auf Kaffee-, Tee- und Kakaopflanzungen (ter Meulen und El-Harith 1983),
- als Futterpflanze für Nutztiere (Payawan 1980; ter Meulen et al 1979) und
- in beschränktem Umfang auch zur menschlichen Ernährung (Lindner 1986).

Diese Verwendungsmöglichkeiten zeigen, daß *Leucaena leucocephala* eine weit größere praktische Bedeutung hat als *Mimosa pudica*.

Die Nutzbarkeit als Nahrungs- und Futterpflanze verdankt *Leucaena leucocephala* ihrem hohen Rohproteingehalt, der mit mehr als 25 % der Trockenmasse angegeben wird (ter Meulen und El-Harith 1985). Dazu kommt der hohe Nährwert des Rohproteins, dessen Aminosäurenmuster dem von Sojabohnen vergleichbar ist (ter Meulen und El-Harith 1985). Außerdem enthält die Pflanze bedeutsame Mengen an Calcium, Phosphor, einigen Spurenelementen und β -Carotin (ter Meulen und El-Harith 1983). Neben der gegenwärtig größten Bedeutung von *Leucaena leucocephala* als Futtermittel für Rinder (ter Meulen et al 1979), wird die Pflanze auch angebaut, um in Form von Blattmehl zu wesentlichen Anteilen in kommerzielles Geflügel- und Schweinefutter eingemischt zu werden (Lowry et al 1984).

Die Verwendbarkeit als Nahrungs- oder Futterpflanze wird jedoch eingeschränkt durch das Vorkommen von Mimosin. Es ist in freier Form in Samen und Blättern enthalten (Malmquist 1950; Szyszka und ter Meulen 1984d). Seine Konzentration beträgt dort 2 bis 5 % der Trockensubstanz (ter Meulen und El-Harith 1985), ist jedoch von der Varietät der Pflanze und den Standortbedingungen abhängig (Szyszka und ter Meulen 1984d) sowie von der Jahreszeit, da die Mimosin-gehalte bei Trockenheit niedriger sind als in der Regenzeit (Szyszka et al 1984b). Die höchsten Mimosinkonzentrationen

finden sich in aktiv wachsendem Pflanzengewebe (Jones und Jones 1979); sie können bis zu 10 % der Trockensubstanz von jungen Blättern ausmachen (Hegarty 1978).

2 Chemie

Mimosin ist chemisch 3-Hydroxy-4-oxo-1(4H)-pyridinalanin und wird auch als Leucaenol und Leucaenin bezeichnet (Windholz et al 1983).

Es hat eine Molekülmasse von 198,18, die Summenformel $C_8H_{10}N_2O_4$ und folgende Strukturformel (Windholz et al 1983):

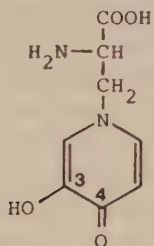
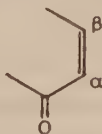


Abb. 1: Chemische Struktur von Mimosin

Der Formel läßt sich entnehmen, daß Mimosin eine α -Aminosäure mit struktureller Ähnlichkeit zu Phenylalanin und Tyrosin ist. Eine weitere Ähnlichkeit, die sich auch bei Röntgenstrukturuntersuchungen bestätigt hat (Mostad et al 1973), besteht zu 3-Hydroxytyrosin, d. h. Dopa. Weiterhin ist bemerkenswert, daß Mimosin eine semichinonartige Teilstruktur hat und eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung darstellt:



Semichinon



α,β -ungesättigtes Carbonyl

Abb. 2: Teilstrukturen von Mimosin

Über die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Mimosin ist bekannt, daß sich die Verbindung in verdünnten Säuren und Laugen löst, während ihre Löslichkeit in Wasser gering und in Methanol und Ethanol noch schlechter ist (Windholz et al 1983). Die Löslichkeit für Wasser wird mit 2 g/l angegeben, wobei die resultierende gesättigte Lösung einen pH-Wert von 4,7 hat (Stecher et al 1960). In organischen Lösungsmitteln ist Mimosin praktisch unlöslich (Windholz et al 1983).

Gelöstes Mimosin hat ein Absorptionsmaximum bei 282 nm ($\log \epsilon = 4,23$; Windholz et al 1983).

In wässriger Lösung liegt Mimosin als Zwitterion vor, für welches ein pK_a -Wert von 2,8 berechnet wurde (Bonting und Schepan 1950). Die Dissoziationskonstanten seiner funktionellen Gruppen betragen: $pK(COOH) = 2,1$; $pK(NH_3^+) = 7,2$; $pK(OH) = 9,2$ (Spenser und Notation 1962).

Bei extremen pH-Werten und Zufuhr von Wärme scheint Mimosin hydrolytisch gespalten zu werden (Hegarty et al 1964a; Wills und Tangendjaja 1981), wobei im sauren pH-Bereich 3,4-Dihydroxypyridin bzw. 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon entsteht (Hegarty et al 1964a; Lowry et al 1983; Tsai und Ling 1974; Wills und Tangendjaja 1981). In alkalischem Milieu wird unter diesen Bedingungen sowohl Mimosin als auch 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon abgebaut (Wills und Tangendjaja 1981). Auch durch pflanzeigene Enzyme (Lowry et al 1983; Lyon 1985; Smith und Fowden 1966; Tangendjaja et al 1983; Tangendjaja et al 1984), Bodenbakterien (Wang et al 1966) und Pansenorganismen (Hegarty et al 1964b; Hegarty et al 1976; Lowry 1981; Reis et al 1975; Shiroma und Akashi 1976; Tangendjaja et al 1983) kann Mimosin zersetzt werden.

An chemischen Eigenschaften der Aminosäure ist eine Chelatbildung mit Metallionen beschrieben (Hashiguchi und Takahashi 1977; Megarrity 1978; Tang und Ling 1975; Thompson et al 1969; Tsai und Ling 1971). Sie ist bekannt bei

Fe^{2+} (Hashiguchi und Takahashi 1977; Tang und Ling 1975), Fe^{3+} (Megarrity 1978; Tang und Ling 1975; Tsai und Ling 1973), Al^{3+} (Hashiguchi und Takahashi 1977; Tang und Ling 1975; Tsai und Ling 1971; Tsai und Ling 1973), Cu^{2+} (Hashiguchi und Takahashi 1977; Tang und Ling 1975; Tsai und Ling 1973), Zn^{2+} (Hashiguchi und Takahashi 1977), Sn^{2+} (Hashiguchi und Takahashi 1977), Pb^{2+} (Tsai und Ling 1973), Ca^{2+} (Tsai und Ling 1973) und Mg^{2+} (Tsai und Ling 1973). Die Stabilität der Chelate nimmt ab in der Reihenfolge Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} und Mg^{2+} (Tsai und Ling 1973).

Eine weitere Reaktion erfolgt mit Pyridoxalphosphat, wobei eine stabile Verbindung gebildet wird (Lin et al 1962 und 1965).

Schließlich gibt es auch Hinweise für eine Komplexbildung von Mimosin und Tyrosin (Grove et al 1978).

Bei Tieren und Pflanzen nimmt Mimosin nicht an der Biosynthese von Proteinen teil (Thompson et al 1969), zählt also zu den sogenannten "nichtproteinogenen" Aminosäuren. In Pflanzen sind mehr als 300 derartige Aminosäuren bekannt (Frohne und Pfänder 1983).

Zum analytischen Nachweis von Mimosin werden kolorimetrische (Hegarty et al 1964a; Matsumoto und Sherman 1951; Megarrity 1978) und chromatographische Verfahren (Acamovic et al 1982; Hegarty et al 1964a; Tangendjaja und Wills 1980) angewandt, wobei die absolute Nachweisgrenze bei einem Nanogramm liegen soll (Tangendjaja und Wills 1980).

3 Stoffwechsel

3.1 Resorption

Mimosin wird bei oraler Aufnahme gut und schnell aus dem Verdauungskanal resorbiert (El-Harith et al 1979; Hegarty et al 1964b; Reis et al 1978; Szyszka und ter Meulen 1984c; Tsai und Ling 1974). Die Resorption erfolgt offenbar z. T. aktiv (Tsai und Ling 1974).

Der Resorptionsumfang beträgt bei Ratten mindestens 75 % einer oralen Einzeldosis (Szyszka und ter Meulen 1984c). Bei Wiederkäuern muß mit einem geringeren Resorptionsumfang gerechnet werden, da im Pansen bereits eine merkliche Metabolisierung stattfindet (Hegarty et al 1964b, 1976 und 1979; Reis et al 1975 und 1978).

3.2 Endogene Verteilung

Resorbiertes Mimosin wird im ganzen Organismus verteilt, findet sich also in allen Körpergeweben und Körperflüssigkeiten (Reis et al 1978; ter Meulen et al 1984; Tsai und Ling 1974).

3.3 Metabolisierung

Bei Ratten und beim Geflügel, d. h. Species mit einhöhligem Magensystem, wird Mimosin nach oraler Aufnahme nicht oder nur in geringem Umfang metabolisiert (D'Mello und Acamovic 1982; El-Harith et al 1979; Szyszka und ter Meulen 1984c).

Das scheint auch der Fall zu sein, wenn die Aminosäure bei Schafen *i n t r a v e n ö s* oder *i n t r a a b o m a s* verabreicht wird (Hegarty et al 1964b). Erfolgt die Mimosinzufuhr bei Wiederkäuern jedoch oral oder ruminal, so werden als Metaboliten 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon (Hegarty et al 1976 und 1979; Jones und Hegarty 1984; Jones und Lowry 1984; Jones und Megarritty 1981; Tangendjaja et al 1983) und/oder 3,4-Dihydroxypyridin (Hegarty et al 1964b; Reis et al 1975 und 1978; Shiroma und Akashi 1976) nachgewiesen. Dabei handelt es sich offenbar um tautomere Formen desselben Metaboliten (s. Abb. 3). Als weiteres Abbauprodukt ist Mimosinamin gefunden worden (Reis et al 1975). Im Pansen muß deshalb mit folgenden Metabolisierungsreaktionen bzw. Metaboliten gerechnet werden:

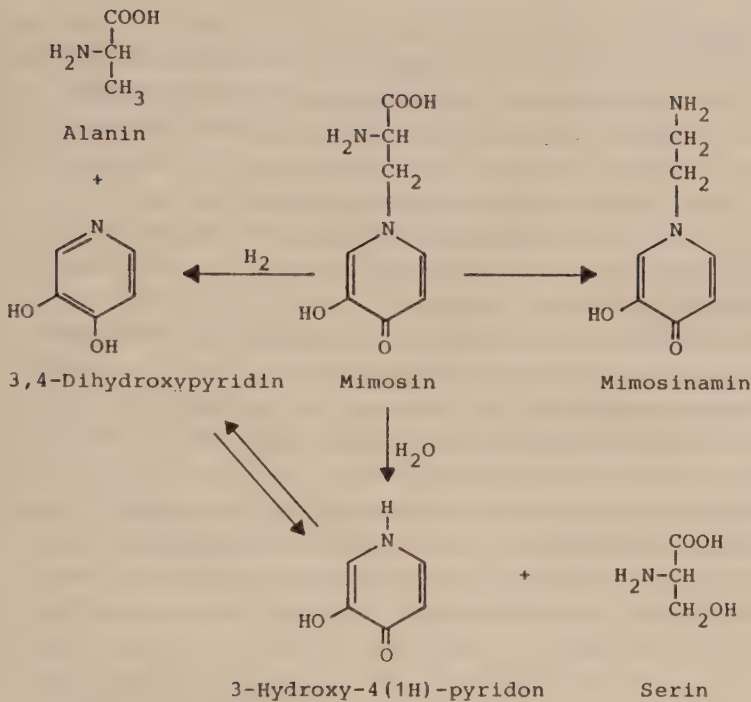


Abb. 3: Metabolisierung von Mimosin im Pansen

In quantitativer Hinsicht spielt der Pyridon- bzw. Pyridin-metabolit mit 40 bis 50 % der Dosis die größte Rolle (Hegarty et al 1964b; Jones und Hegarty 1984); Mimosinamin wird zu etwa 9 % gebildet (Reis et al 1975) und 5 bis 10 % entgehen der Metabolisierung im Pansen (Hegarty et al 1964b). Diese Relationen scheinen jedoch Schwankungen zu unterliegen, da die metabolische Kapazität der Pansenflora unterschiedlich und darüber hinaus an die Verstoffwechselung von Mimosin adaptierbar ist (Hegarty et al 1964b; Jones 1981; Ruskin 1977; Szyszka et al 1984a; Szyszka und ter Meulen 1985).

Die beiden Hauptmetaboliten des Mimosins werden resorbiert, zu 30 bis 70 % mit Glucuronsäure konjugiert und dann in dieser Form renal ausgeschieden (Hegarty et al 1964b und 1979).

3.4 Ausscheidung

Nach einmaliger oraler Aufnahme wird Mimosin von R a t t e n zu etwa 16-17 % in unveränderter Form enteral ausgeschieden (Szyszka und ter Meulen 1984c). Die Ausscheidungsdauer beträgt 24 Stunden; danach wird kein Mimosin mehr im Kot gefunden (Nachweisgrenze ca. 12 µg/g). Hieraus ergibt sich eine "Verdaulichkeit" des Mimosins (orale Aufnahme minus enterale Ausscheidung) von 83-84 % (Szyszka und ter Meulen 1984c).

Die renale Mimosinausscheidung von Ratten beträgt unter gleichen Bedingungen nach 8 Stunden 60,2 %, nach 16 Stunden 70,4 %, nach 24 Stunden 72,1 %, nach 48 Stunden 74,6 % und nach 72 Stunden 74,9 % der oral aufgenommenen Dosis (Szyszka und ter Meulen 1984c).

Diesen Angaben läßt sich entnehmen, daß unmetabolisiertes Mimosin sowohl über den Verdauungskanal als auch über die Nieren schnell eliminiert wird. Bei den beschriebenen Versuchen wurde für Mimosin eine biologische Halbwertszeit von 5,3 Stunden berechnet (Szyszka und ter Meulen 1984c). Ungeklärt bleibt das Stoffwechselschicksal der restlichen Mimosindosis in Höhe von 8-9 %; sie kann metabolisiert oder im Organismus retiniert worden sein.

Bei W i e d e r k ä u e r n (Schafen) sind die Ausscheidungsverhältnisse nach i n t r a v e n ö s e r oder i n t r a a b o m a s a l e r Applikation ähnlich wie bei Monogastriern: Die applizierte Dosis wird überwiegend in unveränderter Form renal ausgeschieden (Hegarty et al 1964b; Reis et al 1975). Es wird jedoch auch Mimosinamin in einem Umfang von etwa 9 % im Urin gefunden (Reis et al 1975). Nach intraruminaler oder oraler Gabe enthält der Urin vor allem 3,4-Dihydroxypyridin (Hegarty et al 1964b; Reis et al 1975) bzw. 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon (Jones und Hegarty 1984). Diese Metaboliten scheinen nach einer gewissen Latenzzeit den Hauptanteil der Ausscheidungsprodukte zu bilden, während

anfänglich Mimosin im Urin überwiegt (Reis et al 1975). Die Gesamtausscheidung von 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon steht in linearer Beziehung zur insgesamt aufgenommenen Mimosinmenge (Jones und Hegarty 1984).

In der Milch wird Mimosin nach oraler Aufnahme kaum gefunden, da seine Metabolisierung im Pansen zu schnell und effektiv abläuft (ter Meulen et al 1979).

Abgesehen von der Tier- und Applikationsart, hat sich gezeigt, daß die Mimosinausscheidung auch durch Mineral-salze modifiziert werden kann. Bei Ratten verursacht die Supplementierung von mimosinhaltigem Futter mit Eisen(II)-salzen eine Zunahme der enteralen und eine Abnahme der renalen Mimosinausscheidung (Tsai und Ling 1974; Yoshida 1944). Beim Geflügel erhöhen Zusätze von Eisen(II)salzen oder Aluminium(III)salzen die Gesamtausscheidung von Mimosin (D'Mello und Acamovic 1982). Es ist naheliegend, diese Effekte mit einer Resorptionsverschlechterung von Mimosin-Metallverbindungen aus dem Verdauungskanal zu erklären (Tsai und Ling 1974).

3.5 Rückstandsbildung

Nach oraler Daueraufnahme finden sich unterschiedliche Mimosinkonzentrationen in Organen und Geweben des Schlachtkörpers. Bei Hühnern sind die höchsten Rückstandswerte in der Leber und den Nieren gefunden worden, die niedrigsten in Herz, Haut und Skelettmuskulatur (ter Meulen et al 1984). Sie lagen nach vierwöchiger oraler Aufnahme von 190 bis 575 mg Mimosin pro kg Körpergewicht und Tag in der Größenordnung von 100 bis 400 ppm (ter Meulen et al 1984). Dabei hat sich gezeigt, daß die Mimosinretention in allen Organen, ausgenommen die Nieren, der Mimosinaufnahme bis zu etwa 450 mg/kg und Tag parallel geht, bei höherer Mimosinbelastung jedoch wieder abnimmt (Szyszka und ter Meulen 1984c; ter Meulen et al 1984). Vergleichbare Beobachtungen sind auch bei anderen Untersuchungen gemacht worden (Szyszka 1980).

Dieses Phänomen ist mit der Aktivierung eines Ausscheidungsmechanismus' bei Überschreiten einer bestimmten Grenzbelastung erklärt worden (Szyszka 1980; Szyszka und ter Meulen 1984a und 1984c), dürfte jedoch eher mit der toxischen Wirkung hoher Mimosindosen (Schädigung des Verdauungskanals mit Resorptionshemmung, Störung der Proteinsynthese mit Wachstumshemmung etc.) zusammenhängen.

Abgesehen von den erwähnten Organen, scheint eine gewisse Mimosinanreicherung nach längerer Mimosinaufnahme auch in Auge und Serum stattzufinden (Tsai und Ling 1974).

Fleisch, Blut und Milch von Rindern sollen nach Aufnahme mimosinhaltiger Pflanzen aufgrund der ruminalen Metabolisierung (s. Punkt 3.3) praktisch frei von Mimosin sein (ter Meulen et al 1979).

4 Toxizität

4.1 Leucaena leucocephala

Die Toxizität von *Leucaena leucocephala* läßt sich nicht pauschal angeben, da sie durch zahlreiche Faktoren modifiziert wird.

Die wichtigste Rolle spielt dabei der Mimosingehalt, der bei den 51 Arten von *Leucaena* unterschiedlich ist (Brewbaker et al 1972) und von Standort und Vegetationsstadium der Pflanze sowie von der Behandlung des geernteten Materials abhängt (Jones und Jones 1979; Matsumoto et al 1951; ter Meulen und El-Harith 1983). Auf die toxikologische Bedeutung einer Behandlung des Erntegutes wird später eingegangen (s. 6.2 Prophylaxe).

4.2 Mimosin

4.2.1 Akute und subakute Toxizität

Die akute orale LD₅₀ (Letaldosis mit durchschnittlich 50 %iger Sterblichkeit) von Mimosin beträgt für Kaninchen 3380 mg/kg Körpergewicht (Ludwig 1981). Die Toxizität von Mimosin ist damit 5 bis 6 mal geringer als die des strukturell ähnlichen Levodopa, dessen akute orale LD₅₀ für Kaninchen mit 609 mg/kg Körpergewicht angegeben wird (Windholz et al 1983).

Die subakute (mehrtägige) orale Letaldosis für nicht adaptierte Schafe liegt nach Szyszka und ter Meulen (1984b) bei 800 mg/kg Körpergewicht. Sie ist bei wiederholter intravenöser Applikation wesentlich niedriger (Hegarty et al 1964b).

Die LD₅₀ für 14 Tage alte Hühnerembryonen (Applikation in die Luftkammer) wird mit 3,5 µmol Mimosin pro Embryo angegeben (Hathcock und Labadan 1975).

4.2.2 Subchronische und chronische Toxizität

Eine Daueraufnahme von 1 % Mimosin mit dem Futter führte bei Mäusen im Laufe von zwei Wochen zum Tod (Lin und Ling 1961).

Von wachsenden Ratten sterben 50 % der Tiere im Laufe von 35 Tagen an einer Mimosinkonzentration des Futters von etwa 0,7 % (El-Harith et al 1979).

Wenn man bei Mäusen eine tägliche Futteraufnahme von 7 g pro 35 g Körpergewicht und bei wachsenden Ratten eine Aufnahme von 20 g pro 100 g Körpergewicht unterstellt, so ergibt sich daraus für Mäuse eine orale LD_{100/14 Tg} von $\leq$ 2000 und für wachsende Ratten eine orale LD_{50/35 Tg} von 1400 mg Mimosin pro kg Körpergewicht und Tag.

Von Nutztieren werden die in Tabelle 1 zusammengefaßten Mimosindosen bei täglicher Aufnahme mit dem Futter ohne Schaden toleriert.

Tab. 1: Toleranzdosen von Mimosin (mg/kg und Tag)

Tierart	I	II
Broiler	160	-
Legehennen	210	-
Kaninchen	230	210
Rinder	180	110
Ziegen	180	170
Schafe	140	120

I: Szyszka und ter Meulen 1984d

II: ter Meulen und El-Harith 1983 und 1985

Die Tabelle bildet keine Stütze für die Auffassung, daß Wiederkäuer mimosinunempfindlicher seien als Monogastrier (ter Meulen und El-Harith 1985), obwohl Mimosin durch den Pansensaft - im Gegensatz zu den Verdauungssäften von Schweinen, Geflügel und sonstigen Monogastriern - in gewissem Umfang abgebaut wird (Shiroma and Akashi 1976). Offenbar werden Wiederkäuer auch durch die entstehenden Metaboliten geschädigt. Eine mögliche Ausnahme bilden die Ruminantia auf Hawaii und Indonesien, da ihre Pansenflora Mimosin angeblich völlig zu entgiften vermag (Jones 1981; Jones und Lowry 1984). Abgesehen davon, soll eine Toxizitätsabschwächung von Mimosin auch durch Adaptation der Pansenflora in Form einer zunächst geringen, langsam steigenden Zufütterung der Aminosäure möglich sein (Hegarty et al 1964b; Szyszka et al 1984a und 1984b).

Erwähnenswert ist außerdem der in Tabelle 1 angegebene Verträglichkeitsunterschied zwischen Broilern und Legehennen. Er wird mit der hohen Proteinsynthese der Broiler erklärt (Szyszka und ter Meulen 1984a) und paßt damit recht gut zu der Beobachtung, daß junge (schnell wachsende) Tiere mimosinempfindlicher sind als erwachsene (Szyszka und ter Meulen 1984a und 1984d).

4.3 Mimosinmetaboliten

Die akute orale LD_{50} der im Pansen entstehenden Hauptmetaboliten des Mimosins (3,4-Dihydroxypyridin bzw. 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon) liegt für Mäuse und Ratten bei etwa 2000 mg/kg Körpergewicht (Hegarty et al 1979). Bei intravenöser Applikation ist ihre Toxizität rund zehn mal größer (Hegarty et al 1979).

In einem zwölfwöchigen Versuch erhielten Mäuse eine Diät mit 1 % 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon, ohne daß ein Todesfall auftrat (Hegarty et al 1979).

Aufgrund solcher Untersuchungen werden die beiden Hauptmetaboliten von Hegarty et al (1979) sowie Shiroma und

Akashi (1976) für weniger toxisch gehalten als Mimosin. Dabei kann ihre offenbar schlechtere Resorption aus dem Verdauungskanal (vgl. die orale und intravenöse Toxizität) als bei Mimosin und eine metabolische Inaktivierung durch Glucuronidierung (Hegarty et al 1964b; Hegarty et al 1979) von Bedeutung sein, zumal die Glucuronide der beiden Metaboliten bei intravenöser Verabreichung weniger giftig sind als die konjugierten Verbindungen (Hegarty et al 1979). Bei oraler Applikation ist der Toxizitätsunterschied allerdings weniger ausgeprägt, da die Glucuronsäure im Verdauungskanal offenbar abgespalten wird (Hegarty et al 1979).

Über die Toxizität von Mimosinamin ist in der Literatur nichts bekannt.

5 Vergiftungsbild

Das Vergiftungsbild von Mimosin ist von großer Bedeutung für das Verständnis seiner Wirkungsweise. Es ist u. a. abhängig von der betroffenen Species, der Applikationsart, der aufgenommenen Mimosindosis und der Aufnahmedauer (Hegarty et al 1964b; Owen 1958; Szyszka und ter Meulen 1984a; ter Meulen et al 1979; Wayman et al 1970). Auch das Alter der vergifteten Individuen scheint eine Rolle zu spielen (Szyszka und ter Meulen 1984d).

5.1 Vergiftungsbild beim Wiederkäuer

5.1.1 Orale Aufnahme

Nach oraler Aufnahme von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen durch Rinder, Schafe und/oder Ziegen wurden folgende Wirkungen beobachtet bzw. Diagnosen gestellt:

- Gewichtsverlust sowie Wachstumsdepression (Clarke et al 1981; Hegarty et al 1964b; Jones und Hutton 1975/76, zitiert nach Szyszka et al 1984a; Jones und Jones 1979),
- trockene schuppige Haut (Jones und Hegarty 1984),
- Haarausfall (Hegarty 1978; Szyszka et al 1984a; Szyszka und ter Meulen 1984d),
- Übermäßige Erregbarkeit (Falvey 1976; Little und Hamilton 1971)

- Apathie (Jones und Jones 1979; Jones und Lowry 1984; Szyszka und ter Meulen 1984b),
- Appetitlosigkeit (Jones 1981; Jones und Jones 1979; Szyszka und ter Meulen 1984b),
- exzessive Salivation (Holmes 1981; Holmes et al 1981; Jones und Jones 1979; Jones et al 1978) von zähem Speichel und Erbrechen von dickem grünem Schleim (Jones und Hegarty 1984),
- Ulceration und Erosion des Zungenepithels sowie Atrophie der Gingiva (Holmes et al 1981),
- Läsionen im Oesophagus (Jones 1981; Jones und Megarrity 1981),
- Störung von Pansenaktivität und Kreislauf (Szyszka und ter Meulen 1984b),
- hämorrhagische Cystitis (Owen 1958),
- Lacrimation (Holmes 1981),
- Katarakt (Holmes et al 1981),
- Kropfbildung (Holmes 1981; Holmes et al 1981; Jones 1981; Jones und Jones 1979; Jones und Megarrity 1981),
- erniedrigte Thyroxinkonzentration im Blut bzw. Serum (Holmes 1981; Jones 1981; Jones und Hegarty 1984; Jones und Jones 1979; Jones und Megarrity 1981; Jones et al 1978),
- Fortpflanzungsstörungen (Hegarty et al 1979; Holmes et al 1981; Jones und Hutton 1975/76, zitiert nach Szyszka et al 1984a) sowie
- Exitus (Jones 1981; Szyszka und ter Meulen 1985).

5.1.2 Abomasale Applikation

Die wiederholte abomasale Verabreichung von 1,4 mmol Mimosin pro kg Körpergewicht und Tag an ein Schaf führte zu folgendem Ergebnis (Hegarty et al 1964b):

- verminderte Futteraufnahme ab dem zweiten Tag,
- Überempfindlichkeit gegen Berührung nach 72 Stunden,
- Haarausfall nach 93 Stunden,
- Exitus nach 93 Stunden,
- Herzstillstand in Diastole,

- zahlreiche subepicardiale Hämorrhagien und
- wenige subepitheliale Hämorrhagien in der Blase.

5.1.3 Intravenöse Applikation

Eine fünftägige intravenöse Gabe von 0,6 mmol Mimosin pro kg Körpergewicht und Tag ergab bei einem Schaf folgendes Vergiftungsbild (Hegarty et al 1964b):

- Futterverweigerung nach 36 Stunden,
- Haarausfall nach 90 Stunden,
- Festliegen nach 120 Stunden,
- Ablösung von Afterklauen und Klauen ab dem sechsten Tag,
- Exitus nach 190 Stunden,
- Herzstillstand in Diastole und
- vergrößerte Nebennieren.

5.2 Vergiftungsbild beim Schwein

Für das Schwein liegen bislang nur Beobachtungen nach oraler Aufnahme von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen vor. Die Wirkungen bestehen in Haarausfall (Owen 1958), Embryontod, Fruchtresorption und Mißbildungen bei den Nachkommen (Wayman et al 1970).

5.3 Vergiftungsbild beim Pferd

Beim Pferd ist nach oraler Aufnahme von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen folgendes Vergiftungsbild bekannt geworden (Owen 1958): Haarausfall, Schwäche, Kachexie und gelegentlich Ringbildung an den Hufen. Bei einem anderen Pferd wurde Stomatitis, haemorrhagische Enteritis, Proctitis, Ödeme an den Hintergliedmaßen und dem Genitale sowie eine akute Laminitis mit nachfolgender Ringbildung an allen vier Hufen festgestellt (Owen 1958).

5.4 Vergiftungsbild beim Kaninchen

Kaninchen zeigten nach oraler Applikation von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen eine Wachstumshemmung (Owen 1958; Szyszka et al 1985) und Haarausfall (Owen 1958).

5.5 Vergiftungsbild beim Geflügel

Beim Geflügel treten nach der Aufnahme von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen Wachstumshemmung bzw. Gewichts-

verlust (D'Mello und Thomas 1978; Szyszkla und ter Meulen 1984a und 1984d; ter Meulen et al 1984) und Diarrhoe auf (Szyszkla und ter Meulen 1984a und 1984d; ter Meulen et al 1984). Ebenfalls beobachtet wurden Apathie (ter Meulen et al 1984), bei Legehennen eine Beeinträchtigung der Legeleistung (Szyszkla und ter Meulen 1984d) und Exitus (ter Meulen und El-Harith 1981, unveröffentlicht, zitiert nach ter Meulen und El-Harith 1985). Ferner wird über eine Verschlechterung der Futterverwertung berichtet (D'Mello und Thomas 1978; Szyszkla und ter Meulen 1984d).

5.6 Vergiftungsbild bei Labortieren

Bei oraler Aufnahme von Mimosin bzw. mimosinhaltigen Pflanzen durch Labortiere (Ratte, Maus) wurden folgende Beobachtungen gemacht

- allgemeine Schwäche (El-Harith et al 1979; El-Harith et al 1981; ter Meulen et al 1981),
- Wachstumshemmung (El-Harith et al 1979; El-Harith et al 1981; El-Harith et al 1983; Hegarty et al 1979; Matsumoto et al 1951; Owen 1958; ter Meulen et al 1981),
- Haarausfall (Crounse et al 1962; El-Harith et al 1981; Hegarty 1978; Matsumoto et al 1951; Owen 1958)
- reversible Lähmung der Hintergliedmaßen bei der Ratte (El-Harith et al 1979),
- Katarakt (El-Harith et al 1979; El-Harith et al 1981; Hegarty 1978; Matsumoto et al 1951; ter Meulen et al 1981; Tsai und Ling 1974),
- Fortpflanzungsstörungen (Hegarty 1978; Osweiler et al 1985),
- Mißbildungen von Nachkommen bei der Ratte (Osweiler et al 1985),
- Exitus (El-Harith et al 1979; Lin und Ling 1961).

Bei der Ratte wird ferner eine reduzierte Futteraufnahme und eine verschlechterte Futterverwertung beschrieben (El-Harith et al 1981; El-Harith et al 1983).

Eine histologische Untersuchung von Mäusen, denen eine Diät mit 0,5 Gewichtsprozent Mimosin ad libitum zur Verfügung stand (Dauer bis zu 20 Wochen), ergab außer einer Atrophie von Haarfollikeln keine pathologischen Befunde (Hegarty et al 1979).

Die physiologisch-chemische Untersuchung von Ratten, welche über drei Wochen eine Diät mit 0,5 Prozent Mimosin erhielten, zeigte folgendes Bild (El-Harith et al 1981):

- Blutserum: signifikante Aktivitätserniedrigung der alkalischen Phosphatase;
leichte, aber signifikante Aktivitätserhöhung von ALAT (GPT), ASAT (GOT) und GLDH
leichte, aber signifikante Konzentrationserhöhung von Harnstoff sowie Glycin, Citrullin und Lysin;
signifikante Konzentrationserniedrigung von Tyrosin, Hydroxyprolin und Glutamin;
- Urin: signifikant erhöhte Ausscheidung von Threonin, Methionin, Isoleucin, Serin, Glutamin, Alanin und Citrullin und eine besonders hohe renale Ausscheidung von Glycin.

6 Therapie

Wie bei jeder Vergiftung, besteht die wichtigste Therapiemaßnahme auch bei einer Schädigung durch Mimosin in der Unterbrechung der Schadstoffaufnahme (Jones und Jones 1979). Zumindest bei Wiederkäuern scheinen allein dadurch die meisten Symptome der Mimosinvergiftung wieder abzuklingen (Falvey 1976; Jones und Jones 1979; Szyszka und ter Meulen 1984b). Man kann Mimosin deshalb als ein sogenanntes "Konzentrationsgift" bezeichnen, dessen Wirkung die Aufrechterhaltung einer bestimmten Mindestkonzentration im Organismus voraussetzt.

Das weitere Vorgehen orientiert sich an den auftretenden Vergiftungssymptomen. Die Behandlung der Mimosinvergiftung erfolgt also symptomatisch. Darüber hinaus konnte bei Rindern durch die Verabreichung von Eisen-, Kupfer- und Zinksalzen eine Besserung der Vergiftungssymptome erreicht werden (Jones et al 1978).

7 Prophylaxe

Das Einmischen von Eisensulfat in gemahlenes mimosinhaltiges Pflanzenmaterial wird auch als prophylaktische Maßnahme empfohlen (El-Harith et al 1979; Hashiguchi und Takahashi 1977; Lindner 1986; Matsumoto et al 1951; ter Meulen und El-Harith 1985; Unterhalt 1980; Wayman et al 1970), wenn auf die Verfütterung mimosinhaltiger Pflanzen nicht verzichtet werden kann. Außerdem soll Aluminiumsulfat wirksam sein (ter Meulen und El-Harith 1985). Die toxisitätsmindernde Wirkung dieser Salze wird mit einer Bindung von Mimosin in Form von Metallchelaten erklärt (Tsai und Ling 1973).

Als weitere prophylaktische Maßnahmen zur Verhütung einer Mimosinvergiftung werden diskutiert:

- a) ein Wässern von *Leucaena leucocephala* (ter Meulen und El-Harith 1983). Dazu läßt man das geschnittene Pflanzenmaterial 3 Tage lang welken und weicht es anschließend einen Tag lang in fließendem Wasser ein. Danach soll das Pflanzenmaterial praktisch mimosinfrei sein.
- b) Silieren der Pflanzen (Lyon 1985; Rosas et al 1980). Dabei wird Mimosin offenbar durch pflanzeigene Enzyme zu 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon abgebaut (Lyon 1985).
- c) eine Anwendung von feuchter Hitze (70 °C) (Lowry et al 1983; Matsumoto et al 1951; Tangendjaja et al 1984; Unterhalt 1980), wodurch Mimosin gleichfalls enzymatisch zu seinem Pyridonderivat abgebaut werden soll.
- d) der Anbau mimosinarmer Pflanzenvarietäten (Jones und Jones 1979; ter Meulen und El-Harith 1985). Es wird über Versuche

berichtet, solche Varietäten zu züchten (Jones und Jones 1979). Sie scheinen bislang jedoch noch nicht erfolgreich zu sein (ter Meulen und El-Harith 1985).

e) eine Beachtung der tierartlich verschiedenen Toleranzdosen für Mimosin (ter Meulen und El-Harith 1983 und 1985; Szyszka und ter Meulen 1984a, 1984d und 1985; Szyszka et al 1984a und 1985).

Besonders interessant ist weiterhin der Vorschlag einer langsamen Gewöhnung an mimosinhaltiges Futter; er wird mit der Entwicklung einer gewissen Mimosintoleranz begründet (Clarke et al 1981), die vor allem bei Wiederkäuern zu beobachten sei (Hegarty et al 1964b; Szyszka et al 1984b). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Selektion von Pansenorganismen, welche in der Lage sind, Mimosin metabolisch zu entgiften. Dies wird jedenfalls von Ziegen auf Hawaii berichtet, in deren Pansen Mimosin nicht nur zu 3-Hydroxy-4 (1H)-pyridon umgesetzt, sondern weiter abgebaut wird (Jones 1981; Jones und Lowry 1984; Jones und Megarritty 1981). Angeblich handelt es sich bei diesen Pansenorganismen um Bakterien (Jones und Lowry 1984).

Möglicherweise ist die Übertragung eines so besiedelten Pansensaftes auf nicht adaptierte Tiere eine weitere Maßnahme zur Verhütung einer Mimosinvergiftung bei Wiederkäuern?

8 Wirkungsmechanismus

8.1 Mimosin

Wie in der Einleitung angedeutet, besteht über die molekulare Wirkungsweise von Mimosin keine allgemein akzeptierte Vorstellung. Es sind jedoch folgende Hypothesen entwickelt worden, die mehr oder weniger belegbar sind:

a) Mimosin verdrängt strukturähnliche Aminosäuren im intermediären Stoffwechsel, z. B. Phenylalanin, Tyrosin und 3-Hydroxytyrosin (Hegarty 1978; Thompson et al 1969).

Als Folge ist eine Störung der Proteinsynthese zu erwarten, die klinisch vor allem als Schädigung sogenannter "Wechselgewebe" wie Haarbälge, Epithelverbände, Knochenmark, Keimdrüsen etc. manifest werden dürfte. Bei graviden Tieren liegt auch eine Störung der Embryonalentwicklung im Bereich des Möglichen.

b) Mimosin verdrängt Glycin bei der Konjugation von Gallensäuren (El-Harith et al 1983).

Die Konsequenz sei eine Bildung atypischer Gallensalze mit Resorptionsstörungen von Fetten und fettlöslichen Vitaminen einschließlich der zu erwartenden Folgewirkungen.

c) Mimosin reagiert mit DNA und DNA-Polymerasen unter Bildung eines ternären Komplexes (Reisner et al 1979).

Dies müßte eine Störung der Nucleinsäuren-Biosynthese (DNA, RNA) und - sekundär - der Proteinbiosynthese zur Folge haben und könnte diverse Mimosinwirkungen erklären, z. B. die

- Hemmung der DNA-Synthese der Schafhaut (Ward und Harris 1976), in Knochenmarkszellen der Maus (Hegarty et al 1978), HEp-2-Zellen (menschliches Larynxepitheliom; Tsai und Ling 1971) und Paramecium tetraurelia (Klasse Ciliaten; Reisner et al 1979);
- Hemmung der RNA-Synthese in HEp-2-Zellen (Tsai und Ling 1971) sowie Paramecium tetraurelia (Reisner et al 1979);
- Mitosehemmung in den Haarzwiebeln von Schafen (Hegarty et al 1964b), den Linsenepithelzellen von Ratten mit mimosininduziertem Katarakt (Sallmann et al 1959) und HEp-2-Zellen (Tsai und Ling 1971);
- Hemmung der Proteinsynthese bei Paramecium tetraurelia (Reisner et al 1979);
- Hemmung des Tumorwachstums (Hegarty 1978; Tsai und Ling 1971) und
- Degeneration der Haarzwiebeln von Schafen (Hegarty et al 1964b) sowie Haarfollikelzellen der Maus (Montagna und Yun 1963).

d) Mimosin komplexiert Pyridoxalphosphat und hemmt dadurch Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme (Hegarty 1978; Thompson et al 1969), z. B. die

- Aspartat Aminotransferase (EC 2.6.1.1) im Schweineherzen (Lin et al 1962a);
- Tyrosin Decarboxylase (EC 4.1.1.25) in tierischen Geweben (Crounse et al 1962);
- Aromatische-L-Aminosäuren Decarboxylase (EC 4.1.1.28) in vitro (Lin et al 1963);
- Cystathionin β -Synthase (EC 4.2.1.22) in der Rattenleber (Hylin 1969; Unterhalt 1980) und die
- Cystathionin γ -Lyase (EC 4.4.1.1) in der Rattenleber (Hylin 1969; Unterhalt 1980).

Naheliegende Folgen sind diverse Störungen des intermediären Stoffwechsels.

e) Mimosin komplexiert Metallionen und hemmt so Metallionen-abhängige Enzyme (Hegarty 1978; Thompson et al 1969) wie die

- Succinat Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) aus Mitochondrien der Rattenleber (Tsai 1961);
- Catechol Oxidase (EC 1.10.3.1) aus tierischen Geweben (Crounse et al 1962), deren Hemmung sich als kompetitiv erwiesen hat;
- Catalase (EC 1.11.1.6) (Tsai 1961);
- Prolin Hydroxylase (EC 1.14.11.2) in embryonalem Hühnerknorpel (Tang und Ling 1975);
- Dopamin β -Monooxygenase (EC 1.14.17.1) (Hashiguchi und Takahashi 1977) sowie die
- Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) in Mäusenieren (Chang 1960) und Ratten Serum (El-Harith et al 1981), deren Aktivität durch Mg^{2+} -Ionen wieder hergestellt werden konnte (Chang 1960).

Die Folgen sind auch hier Stoffwechselstörungen verschiedener Art, darunter eine Hemmung der Kollagenbiosynthese (Tang und Ling 1975). Sie kommt u. a. als Ursache der bekannten Kataraktbildung bei Mimosinaufnahme sowie hämorrhagische

gischer Entzündungen im Bereich der Iris, Cornea und Conjunctiven (Sallmann et al 1959) in Frage und spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der mimosininduzierten Proteinurie (Lin und Ling 1961).

8.2 Mimosinmetaboliten

Die molekulare Wirkungsweise der im Pansen entstehenden Mimosinmetaboliten scheint mit den Wirkungen der Ausgangssubstanz vergleichbar zu sein.

Dies gilt z. B. für den thyreostatischen Effekt von 3,4-Dihydroxypyridin bzw. 3-Hydroxy-4(1H)-pyridon, welcher auf einen gehemmten Jodeinbau in Thyreoglobulin zurückzuführen ist (Hegarty et al 1976 und 1979) und auf einer Tyrosinverdrängung bei der Biosynthese des tyrosinreichen Globulins zu beruhen scheint.

Auch die Hemmung der DNA-Biosynthese in der Schafhaut (Ward und Harris 1976) sowie in HEP-2-Zellen (Tsai und Ling 1971) und die Hemmung der RNA-Synthese, der Mitoserate und des Wachstums dieser Zellen (Tsai und Ling 1971) dürfte bei 3,4-Dihydroxypyridin auf gleiche Weise zustande kommen wie bei Mimosin.

Weiterhin läßt sich die irreversible Hemmung der Catechol Methyltransferase (EC 2.1.1.6) durch 3,4-Dihydroxypyridin (Borchardt 1973) mit der Strukturähnlichkeit von Substrat (Catechole) und "Fehlsubstrat" (Mimosinmetabolit) erklären

Schließlich verursacht auch Mimosinamin bei Knochenmarkszellen von Mäusen eine Hemmung der DNA-Biosynthese (Hegarty et al 1978) wie Mimosin und dessen Hauptmetaboliten im Pansen.

9 Hypothesen zum Wirkungsmechanismus

Die in der Literatur beschriebenen molekularen Wirkungsmechanismen vermögen das komplexe Vergiftungsbild von Mimosin nach Szyszka und ter Meulen (1984c und 1984d) nicht in befriedigender Weise zu erklären. Es erscheint deshalb angezeigt, weitere Möglichkeiten experimentell zu überprüfen, die im folgenden zunächst erläutert werden.

9.1 Oxidative Schädigung in vivo

Eine bislang ungeprüfte Möglichkeit ist die Schädigung oxidationsempfindlicher Strukturen, vor allem zellulärer und subzellulärer Membranen (Lipidperoxidation) durch Mimosin. Sie wird durch die strukturbedingten Möglichkeiten der Reduktion des Mimosinmoleküls zu einem radikalischen Intermediat und der Reaktion von Mimosin mit Glutathion nahegelegt.

Reduktion. Die Reduzierbarkeit von Mimosin beruht auf dem chinoiden Charakter des Pyridonringes (Mostad et al 1973) und kann nach Bonting und Schepan (1950) auf folgende Weise zu einem Radikal führen:

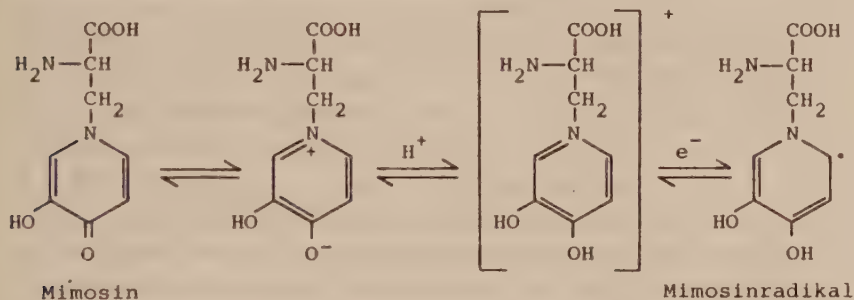


Abb. 4: Reduktion von Mimosin

Radikale sind aufgrund ihres ungepaarten Elektrons sehr reaktionsfreudig und wirken in aller Regel oxidierend, indem sie ihr "einsames" Elektron zum Elektronenpaar ergänzen (Slater 1972). Die pathogenetische Bedeutung freier Radikale ist gut dokumentiert (Demopoulos 1973; Mason 1982; Mc Cay 1981; Mead 1976; Myers 1973; Pryor 1976; Reynolds und Moslen 1980; Slater 1972; Tappel 1973; Zimmermann 1982). Sie beruht vor allem auf einer oxidativen Schädigung polyungesättigter Fettsäuren von Membranlipiden durch Lipidperoxidation, die in der folgenden Abbildung veranschaulicht ist (Kreuzer 1982).

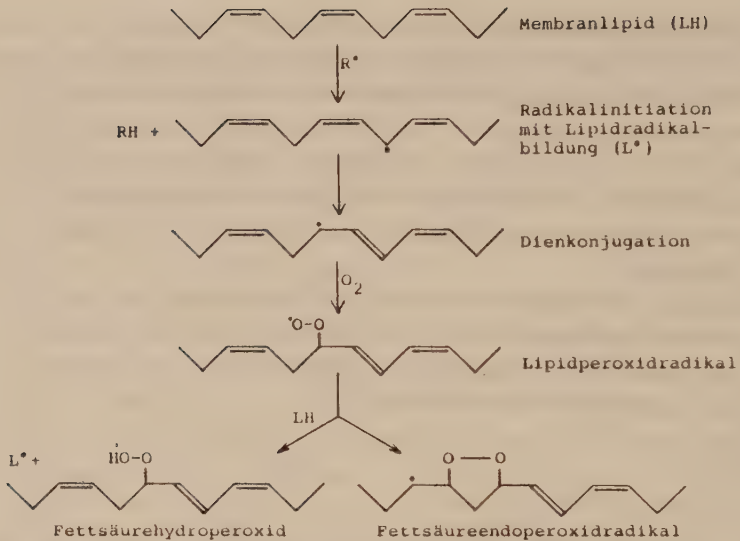


Abb. 5: Schädigung eines Membranlipids durch Radikale ($R^\bullet$)

Als Indikator einer Radikalbildung *in vivo* gilt die Exspiration kurzkettiger Kohlenwasserstoffe, die als Folgeprodukte der Lipidperoxidation in der Atemluft erscheinen (Cohen 1979; Mitchell et al 1984; Riely et al 1974; Tappel und Dillard 1981). Ein weiterer Indikator ist der Verbrauch von Glutathion, der sich u. a. in der Leber nachweisen läßt (Sies et al 1982).

Reaktion mit Glutathion. Eine direkte Reaktion von Mimosin mit Glutathion ist in Erwägung zu ziehen, weil Mimosin als α, β -ungesättigte Carbonylverbindung aufgefaßt werden kann, von welchen bekannt ist, daß das elektrophile β -Kohlenstoffatom mit dem nucleophilen Glutathion reagiert (Chassaüd 1976; Sykes 1976). Die Reaktion ist in Abbildung 6 angegeben.

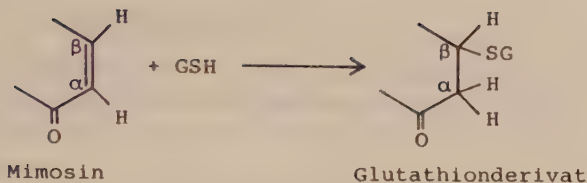


Abb. 6: Reaktion von Mimosin mit Glutathion (GSH)

Als Folge einer solchen Reaktion ist ein Glutathionverbrauch zu erwarten. Er wäre von erheblicher pathogener Bedeutung, da Glutathion u. a. eine Rolle spielt als intrazelluläres Reduktionsmittel, das an der Inaktivierung von freien Radikalen und Peroxiden sowie an der Entgiftung von Xenobiotica beteiligt ist (Meister 1982). Mimosin könnte deshalb auch via Glutathionverarmung des Organismus zu einem Anstieg der Lipidperoxidation führen (Younes und Siegers 1980).

9.2 Verarmung an essentiellen Spurenelementen

Die Reaktion von Mimosin mit diversen Schwermetallen (Hashiguchi und Takahashi 1977; Tsai und Ling 1973) und die protektive Wirkung von Metallsalzen bei der Verfütterung von mimosinhaltigen Pflanzen (Jones et al 1978; Matsumoto et al 1951; Ross und Springhall 1963) legen die Annahme nahe, daß Mimosin die Resorption metallischer Spurenelemente aus dem Verdauungskanal sowie ihre endogene Bioverfügbarkeit einschränkt und/oder ihre renale Ausscheidung erhöht.

Eine renale Ausscheidungsbeschleunigung von Schwermetallen ist von zahlreichen chelatbildenden Antidota, z. b. Dimer-caprol, D-Penicillamin, Deferoxamin, Edetat etc., bekannt und wird bei Schwermetallvergiftungen therapeutisch genutzt (Daunderer 1981; Henschler 1987; Wirth und Gloxhuber 1985). Ihre längerdauernde Anwendung kann jedoch Nebenwirkungen in Form von Mangelsymptomen von essentiellen Spurenelementen hervorrufen (Henschler 1987). Dies könnte auch bei Mimosin

der Fall sein, das besonders bei c h r o n i s c h e r Aufnahme toxisch ist und Vergiftungssymptome hervorruft, die mit Cupfer-, Eisen-, vor allem aber Zinkmangelzuständen vereinbar sind.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1 Vorbemerkung

Gegenstand der durchgeführten experimentellen Versuche ist die Untersuchung des toxikologischen Wirkungsmechanismus' von Mimosin.

Als Versuchstiere sind wachsende und adulte männliche und weibliche Mäuse verwendet worden, da diese Tiere eine hohe Stoffwechselaktivität haben.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen sich in drei Fragestellungen unterteilen:

- Wirksamkeitsprüfung des im Handel erworbenen Mimosins an den verwendeten Versuchsmäusen;
- Untersuchung von Mimosin auf oxidierende Eigenschaften in vivo (Lipidperoxidation) und
- Untersuchung von Mimosin auf chelatbildende Eigenschaften in vitro und in vivo.

2 Wirksamkeitsprüfung von Mimosin

Zur Wirksamkeitsprüfung in vivo ist Mimosin 14 Tage lang in verschiedener Dosierung mit der Magensonde an Versuchstiere verabreicht worden. Gleichzeitig wurde der Allgemeinzustand, das Körpergewicht und die Überlebensrate registriert.

2.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung

Die Versuchstiere waren männliche und weibliche weiße Mäuse mit einem Ausgangsgewicht von ca. 20 g aus der Zucht des Institutes.

Die Tiere wurden konventionell gehalten und ernährt. Ihre Nahrung bestand aus der "Ratten- und Mäusehaltungsdiät H 1003" der Fa. ALMA KRAFTFUTTERWERK in Kempten und aqua font.; sie stand ganztägig ad libitum zur Verfügung.

Die Haltungsdiät H 1003 war folgendermaßen beschaffen (Herstellangaben):

Umsetzbare Energie: 11360 J/kg

Zusammensetzung (Masse in % der Diät):

- Mais 32,0
- Weizen 20,0
- Sojaschrot, extrahiert 18,0
- Maisarin 10,0
- Luzernegrasgrünmehl 6,0
- Fischmehl 3,0
- Melasse 3,0
- Dorschmehl 2,0
- Mineralstoffmischung 2,0
- Vitamin-Vormischung 2,0
- Magermilchpulver 1,0
- Futterfett 1,0

Garantiewerte (Masse in % der Diät):

- Rohprotein 20,0
- Rohasche 7,0
- Rohfaser 5,0
- Rohfett 4,0

Mineralstoffe (g/kg Diät):

- Calcium 10,0
- Phosphor 7,4
- Natrium 5,1
- Magnesium 2,4
- Kalium 9,3

Spurenelemente- Zusatz (mg/kg Diät):

- Eisen 50
- Mangan 50
- Zink 12
- Cupfer 5
- Jod 0,2

Vitamin-Zusätze (mg/kg Diät, wenn nicht anders angegeben):

- Vitamin A 15000 IE/kg
- Vitamin D₃ 500 IE/kg
- Vitamin E 150
- Vitamin K₃ 10
- Vitamin B₁ 10
- Vitamin B₂ 20
- Vitamin B₆ 15
- Vitamin B₁₂ 0,03
- Ca-D-Pantothenat 50
- Nicotinsäure 50
- Cholin 1000
- Folsäure 5
- Biotin 0,06
- Vitamin C 50

Aminosäuren (g/100 g Rohprotein):

- Lysin 6,1
- Lysin, verfügbar 2,8
- Methionin plus Cystein 4,2 (50 % als Methionin)
- Phenylalanin plus Tyrosin 9,0 (60 % als Phenylalanin)
- Arginin 6,8
- Histidin 2,4
- Tryptophan 1,3
- Threonin 4,0
- Isoleucin 4,7
- Leucin 9,4
- Valin 5,2

Fettsäuren (bezogen auf 100 g Fett, Mittelwerte):

- Caprylsäure C 8 0,3 %
- Caprinsäure C 10 0,3 %
- Laurinsäure C 12 4,2 %
- Myristinsäure C 14 2,6 %
- Palmitinsäure C 16 16,8 %
- Stearinsäure C 18 6,6 %

- Octadecensäure C 18:1 19,2 %
- Linolsäure C 18:2 36,9 %
- Linolensäure C 18:3 2,6 %
- Arachinsäure C 20 7,6 %
- Behensäure C 22 2,6 %
- Docosadiensäure C 22:2 0,3 %

Rückstands- Analytik:

- Hexachlorcyclohexan-Isom.
- Hexachlorbenzol
- Aldrin
- Dieldrin
- Heptachlor
- Heptachlorepoxyd
- α - γ Chlordan
- Endrin
- p,p'DDE
- p,p'DDD
- o,p'DDT
- p,p'DDT
- Quecksilber
- Blei
- Cadmium
- Arsen
- Chrom

Ergänzende Kontrollen:

- Aflatoxin
- Mikrobieller Status

2.2 Mimosin, Mimosinapplikation

Das zur Wirksamkeitsprüfung verwendete Mimosin war "L-Mimosin, 99 %, aus Koa Hoalesamen" der Fa. SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen.

Es wurde je 6 Versuchstieren mit der Magensonde 14 Tage lang vormittags als frisch bereitete wässrige Suspension (aqua dest.) in einem Volumen von 10 ml pro kg Körpergewicht verabreicht.

Die Kontrollgruppe wurde lediglich mit dem Suspensionsmittel belastet.

2.3 Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung

Allgemeinzustand. Im Laufe des Versuches zeigten die später gestorbenen Tiere ein rauhes ungepflegtes Haarkleid sowie eine erkennbare Apathie 1 bis 2 Tage vor dem Todeseintritt.

Körpergewicht. Die Entwicklung des Körpergewichtes geht aus der folgenden Tabelle hervor.

Tab. 1: Körpergewichtsentwicklung von Mäusen bei siebentägiger oraler Mimosinbelastung (g; $\bar{x}$ +s) (a)

Versuchsdauer (Tg)	Mimosindosierung (mmol/kg·Tag)				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
<u>männliche Tiere</u>					
0	19,6 1,0	19,6 1,2	19,6 1,4	19,6 0,7	19,6 0,8
7	23,1 2,0	22,8 2,3	22,7 1,7	21,3 1,8	16,3 (b) 2,4
<u>weibliche Tiere</u>					
0	19,7 1,5	19,7 2,0	19,7 1,3	19,7 2,2	19,7 1,8
7	22,2 1,6	22,9 2,7	21,2 2,2	21,4 3,4	18,8 1,9

(a): umgerechnet auf gleiche Ausgangsgewichte (Parallelverschiebung); (b): $p < 0,01$ gegen Kontrollgruppe (LORD-Test); s: Standardabweichung der Einzelwerte; $\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert

Aus Tabelle 1 ergibt sich, daß Mimosin im Laufe von 7 Tagen bei männlichen und weiblichen Tieren nicht nur eine Wachstumsdepression, sondern auch eine dosisabhängige Abnahme des Körpergewichtes verursacht. Dies gilt auch für die weiblichen Versuchstiere der höchsten Dosierung, deren Durchschnittsgewicht (18,8 g) relativ zu hoch ist, weil es von den schwereren drei überlebenden Mäusen dieser Versuchsgruppe berechnet wurde.

Gehäufte Todesfälle von leichteren Tieren, d. h. eine Selektion zugunsten schwererer Einzeltiere, sind auch der Grund, weshalb die Körpergewichtsentwicklung in der zweiten Versuchswoche nicht mehr auswertbar war.

Überlebensrate. Die Überlebensraten bei der Wirksamkeitsprüfung von Mimosin sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Überlebensrate von Mäusen bei vierzehntägiger oraler Mimosinbelastung

Versuchsdauer (Tg)	Mimosindosierung (mmol/kg·Tag)				
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0
<u>männliche Tiere</u>					
0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
7	6/6	6/6	6/6	5/6	6/6
14	6/6	6/6	5/6	4/6	2/6
<u>weibliche Tiere</u>					
0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
7	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6
14	6/6	4/6	5/6	4/6	1/6

Tg: Tage

Aus der Tabelle geht hervor, daß die toxische Wirkung von Mimosin (hier: Sterblichkeit) zeit- und dosisabhängig ist: Die Wirkung ist proportional der Tagesdosis mal Zeit. Ein geschlechtsspezifischer Wirkungsunterschied ist nicht erkennbar.

Der Tabelle läßt sich weiter entnehmen, daß die o r a l e LD_{50/14 Tg} von Mimosin für männliche und weibliche Mäuse zwischen 2 und 4 mmol pro kg Körpergewicht und Tag zu erwarten ist.

3 Untersuchung von Mimosin auf oxidierende Eigenschaften in vivo

Zur Prüfung auf oxidierende Eigenschaften, d. h. eine Lipidperoxidation in vivo, ist Mimosin an adulte unvorbehandelte und wachsende methioninarm ernährte Versuchstiere parenteral verabreicht worden. Außerdem wurde die Beeinflussung der eiseninduzierten Lipidperoxidation (Schmid und Christoph 1980) durch parenteral appliziertes Mimosin an adulten unvorbehandelten Versuchstieren untersucht.

Als Indikatoren einer Lipidperoxidation sind Ethan (Riely et al 1974) und Ethen (Lieberman und Mapson 1964; Lieberman und Hochstein 1966) in der Expirationsluft sowie die Abnahme der Glutathionkonzentration in der Leber der Versuchstiere (Mitchell et al 1984) bestimmt worden.

3.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung

Die a d u l t e n Versuchstiere waren männliche und weibliche weiße Mäuse mit einem Körpergewicht von etwa 40 g aus der Zucht des Institutes. Die Tiere wurden konventionell gehalten und ernährt, wie oben beschrieben (s. 2.1).

Die w a c h s e n d e n Versuchstiere waren männliche weiße Mäuse mit einem Körpergewicht von ca. 20 g aus institutseigener Zucht. Sie wurden konventionell gehalten und ernährt, zum Teil jedoch 7 Tage vor dem Versuch zur Erniedrigung des Glutathiongehaltes der Organe und Gewebe (Schmid 1986) auf methioninarme Sonderdiät C 1007 der Fa. ALTROMIN in Lage/Lippe umgestellt. Diese Diät hatte folgende Zusammensetzung (Herstellerangaben):

C 1007 Methionin-arm

Wertbestimmender Bestandteil

	Anteil mg/kg
001 ROHPROTEIN	104.905,675
002 ROHFETT	51.061,135
003 ROHFASER	32.591,405
004 ROHASCHIE	52.616,604
005 ROHWAASSER	95.502,614
007 DISACCHARIDE	141.264,600
008 POLYSACCHARIDE	499.776,100
011 LYSIN	6.476,400
012 METHIONIN	1.266,000
013 CYSTIN	1.106,400
014 THREONIN	3.814,800
015 TRYPTOPHAN	931,200
016 ARGININ	7.616,400
017 HISTIDIN	2.548,800
018 ISOLEUCIN	4.341,600
019 LEUCIN	8.432,400
020 PHENYLALANIN	5.854,800
021 VALIN	4.437,600
022 ALANIN	3.876,000
024 ASPARAGINSÄURE	10.922,400
026 GLUTAMINSÄURE	18.656,400
027 GLYKOKOLL	4.027,200
028 PROLIN	9.308,400
029 SERIN	4.875,600
030 TYROSIN	3.854,400
031 VITAMIN A	5,160
032 VITAMIN D3	0,013
033 VITAMIN E	163,550
034 VITAMIN K3	10,000
035 VITAMIN B1	20,000
036 VITAMIN B2	20,000
037 VITAMIN B6	15,000
038 VITAMIN B12	0,030
039 NIKOTINSÄURE	50,000
040 PANTOTHENSÄURE	50,000
041 FOLSÄURE	10,000
042 BIOTIN	0,200
043 CHOLINCHLORID	1.000,000
044 p-AMINOBENZOSÄURE	100,000
045 INOSIT	100,000
046 VITAMIN C	20,000
047 CALCIUM	9.503,296

Wertbestimmender Bestandteil

	Anteil mg/kg
048 PHOSPHOR	7.501,642
049 MAGNESIUM	750,153
050 NATRIUM	2.501,478
051 KALIUM	7.117,476
052 SCHWEFFL	1.406,135
053 CHLOR	1.804,648
054 EISEN	180,165
055 MANGAN	100,901
056 ZINK	30,978
057 KUPFER	12,319
058 JOD	0,410
059 MOLYBDAN	0,197
060 FLUOR	4,077
061 SELEN	0,247
062 KOBALT	0,129
063 NICKEL	0,002
073 BLEI	0,302
074 ARSEN	0,038
081 CAPRYSÄURE	2,500
083 CAPRINSÄURE	2,500
086 LAURINSÄURE	2,500
088 MYRISTINSÄURE	2,500
090 PENTADECANSÄURE	2,500
091 PALMITINSÄURE	2,500
092 PALMITOLEINSÄURE	2,500
095 MARGARINSÄURE	2,500
096 STEARINSÄURE	2,500
097 ÖLSÄURE	1.250,000
100 LINOLSÄURE	10.950,000
102 LINOLENSÄURE	35.050,000
104 ARACHINSÄURE	2,500
105 CIS-ETICOS-5-ENSÄURE	2,500
107 11,14-ETICOSADIENSÄURE	2,500
109 ARACHIDONSÄURE	2,500
110 5-17-ETICOSAPENTAENS.	2,500
112 BEHEMSÄURE	2,500
114 BRASSIDINSÄURE	2,500
115 4-19-DOCOSAHEXAENS.	2,500
116 TRICOSANSÄURE	2,500
117 LIGNOCERINSÄURE	2,500
118 NERVONSÄURE	2,500

3.2 Gase, Chemikalien und Lösungen bzw. Suspensionen

Bei der Versuchsdurchführung haben folgende Gase, Chemikalien und Lösungen Verwendung gefunden:

a) Gase

- Wasserstoff (H_2), 99,999 Vol%
- LINDE Unterschleißheim
- Sauerstoff (O_2), 99,995 Vol%
- LINDE Unterschleißheim
- Stickstoff (N_2), 99,9995 Vol%
- LINDE Unterschleißheim
- Synthetische Luft (20 Vol% O_2 + 80 Vol% N_2)
mit weniger als 5 μ l/l Kohlenwasserstoffen
- LINDE Unterschleißheim
- Ethan (C_3H_8), als Prüfgas
- LINDE Unterschleißheim
- Ethen (C_2H_4), als Prüfgas
- LINDE Unterschleißheim

b) Chemikalien

- Natriumchlorid ($NaCl$), p. a.
- MERCK Darmstadt
- Natrium-di-hydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), p. a.
- MERCK Darmstadt
- Di-Natriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), p. a.
- MERCK Darmstadt
- Eisen(II)sulfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), p. a.
- MERCK Darmstadt
- Diethylether ($C_4H_{10}O$), reinst
- MERCK Darmstadt
- Trichloressigsäure (CCl_3COOH), p. a.
- MERCK Darmstadt
- L-Mimosin aus Koa Hoalesamen, 99 %
- SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen
- Di-Natrium-Edetat ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), p. a.
- MERCK Darmstadt

- 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) ($C_{14}H_8N_2S_4$)
SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen
- Glutathion ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$), oxidierte Form (GSSG), 99 %
SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen
- Glutathionreduktase (NAD(P)H) (EC 1.6.4.2)
SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen
- NADPH, 98-99 %
SIGMA CHEMIE GMBH Deisenhofen
- Atemkalk, DRÄGER-Sorb 800^R
DRÄGERWERK AG Lübeck
vor Gebrauch 1 h lang bei 100 °C getrocknet

c) Lösungen bzw. Suspensionen

- Natriumchloridlösung 0,154 molar:
9,0 g Natriumchlorid ad 1000 ml aqua dest.
- Eisensulfatlösung, 0,1 molar:
27,802 g Eisen(II)sulfat ad 1000 ml aqua dest.
und diverse Verdünnungen mit aqua dest.
- Phosphatpuffer, pH 7,4:
 $252 \text{ mg NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1900 \text{ mg Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 234,5 \text{ mg}$
Di-Natrium-Edetat + aqua bidest. ad 100 ml
- Trichloressigsäure-Lösung, 0,306 molar:
50 g Trichloressigsäure ad 1000 ml aqua bidest.
- Mimosinsuspension, diverse Konzentrationen
L-Mimosin suspendiert in aqua dest.
- DTNB-Lösung:
120 mg DTNB + Phosphatpuffer ad 50 ml
- Glutathion-Lösung, 0,979 molar:
30 mg Glutathion (GSSG) + 50 ml Phosphatpuffer
und weitere Verdünnungen
- NADPH-Lösung:
30 mg NADPH + Phosphatpuffer ad 100 ml
- Glutathionreduktase-Lösung:
500 U Glutathionreduktase + Phosphatpuffer ad 100 ml

3.3 Bestimmung der Kohlenwasserstoffexspiration

3.3.1 Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der Ethan- und Ethenexspiration erfolgte nach Schmid et al (1983). Dazu ist je 1 Versuchsgruppe von 4 Tieren nach der Verabreichung von Mimosin und Eisensulfat in einen gasdichten Exsiccator mit einem Leervolumen von 872 ml verbracht worden, welcher 100 g Atemkalk zur Absorption des exspirierten Kohlendioxids enthielt. Dann wurde der Exsiccator 5 Minuten lang mit synthetischer Luft gespült und über ein Sperrventil an eine drucklose Sauerstoffversorgung angeschlossen. Nach Ablauf einer meist mehrstündigen Expositionszeit wurden dem Exsiccator 10 ml Gas über ein Gummiseptum entnommen und auf die akkumulierten Kohlenwasserstoffe analysiert.

Die Analyse erfolgte mit einem Gaschromatographen, Modell Fractovap 4100 der Fa. CARLO ERBA STRUMENTATIONE in Mailand. Das Gerät war mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet, der mit Wasserstoff und synthetischer Luft betrieben wurde. Als Trennsäule fand eine 5 m lange Stahlsäule mit 2 % Carbowax 20 M auf Porasil C mit einer Korngröße von 80-100 mesh Verwendung. Die Betriebstemperatur der Säule betrug 50 °C, die Temperatur des Detektors 120 °C. Als Trägergas wurde nachgereinigter Stickstoff mit einer Flußrate von 30 ml/min verwendet.

Ethan und Ethen wurden unter Verwendung von Referenzgasen anhand von Retentionszeiten und "peak spiking" identifiziert. Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 1 dargestellt.

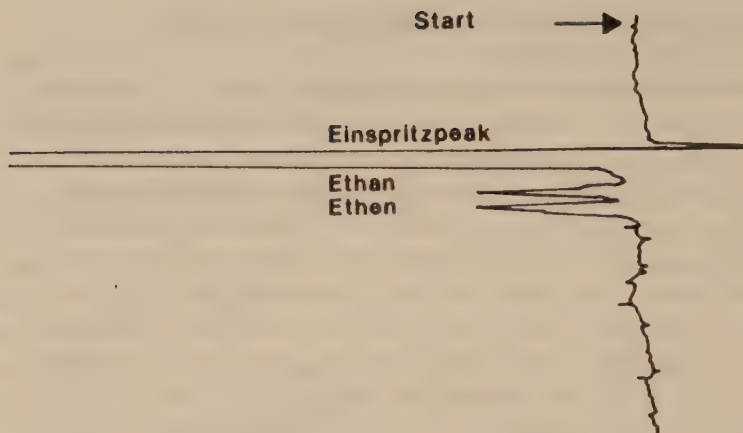


Abb. 1: Gaschromatogramm von 0,05 $\mu\text{l/l}$ Ethan ($t_R = 3,60$ min) und 0,05 $\mu\text{l/l}$ Ethen ($t_R = 3,90$ min) in synthetischer Luft

Der vorstehenden Abbildung läßt sich entnehmen, daß die Retentionszeit (t_R) von Ethan und Ethen unter den angegebenen Versuchsbedingungen 3,60 bzw. 3,90 Minuten beträgt und daß ein unspezifischer Einspritzpeak mit einer Retentionszeit von 2,85 Minuten registriert wird.

Die Konzentrationsbestimmung von Ethan und Ethen erfolgte mit Hilfe von Eichkurven, welche die Peakhöhe (H) als Funktion der Gaskonzentration (C; $\mu\text{l/l}$) beschreiben. Im gewählten Meßbereich bestand ein linearer Zusammenhang der Form

$$H = a + bC \quad (\text{cm})$$

mit folgenden Werten für den Regressionsparameter (a) bzw. -koeffizienten (b) sowie die zugehörigen Korrelationskoeffizienten (r) und deren Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Annahme einer signifikanten Korrelation (p):

Gas	a	b	r	p <
Ethan	0,171	91,514	0,999	0,001
Ethen	0,362	84,086	0,999	0,001

Die Eichkurven sind in den beiden folgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

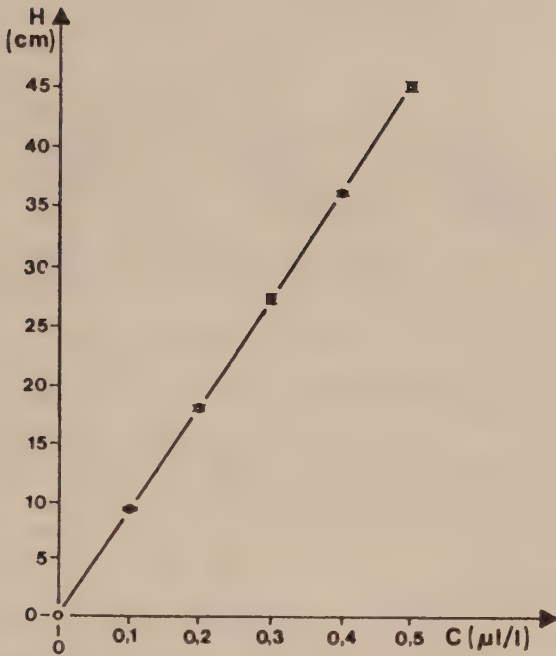


Abb. 2: Eichkurve für Ethanol ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

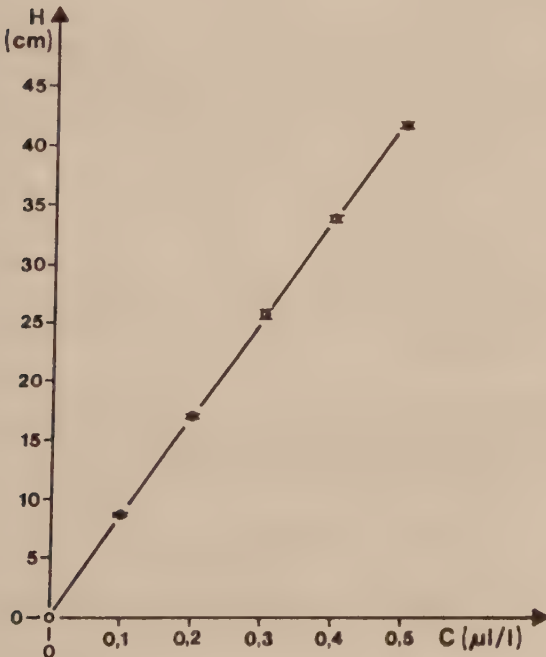


Abb. 3: Eichkurve für Ethen ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

Anhand der Regressionsgeraden wurde die von den Versuchstieren expirierte Ethan- und Ethenmenge nach folgender Formel berechnet (Schmid 1984):

$$M = \frac{44,64 \cdot (H - a) \cdot V}{b \cdot KG} \quad (\text{nmol/kg} \cdot t)$$

wobei die einzelnen Symbole folgende Bedeutung haben:

- M: Exspirierte Kohlenwasserstoffmenge (nmol/kg KG und t)
H: Peakhöhe (cm)
a, b: Regressionsparameter (Achsenabschnitt) bzw. Regressionskoeffizient (Steigungsfaktor)
V: Nettovolumen des Exsiccators (ml)
KG: Körpergewicht der Versuchstiere (g)
t: Expositionszeit (h)

3.3.2 Ergebnisse der Exspirationsuntersuchungen

Mimosin. Die Beeinflussung der spontanen Ethan- und Ethenexpiration der Versuchstiere durch Mimosin ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Ethan- und Ethenexpiration von Mäusen nach Mimosinbelastung

Dosis (a) (nmol/kg)	n	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)
<u>weibliche Mäuse; KG 38,0±2,1 g</u>			
<u>Mimosin ip 0 h vor Exposition; t = 1 h</u>			
0,0	1	1,2	1,1
2,0	1	1,3	1,1
4,0	1	1,0	0,6
<u>weibliche Mäuse; KG 37,2±3,6 g</u>			
<u>Mimosin ip 0 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
0,0	2	2,2 (2,2-2,3)	1,5 (1,4-1,6)
0,25	1	2,4	1,3
0,5	1	1,7	0,6
1,0	1	1,7	1,5
2,0	1	1,9	0,9

Fortsetzung Tabelle 3

Dosis (a) (mmol/kg)	n	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)
<u>weibliche Mäuse; KG 36,5+4,2 g</u>			
<u>Mimosin ip 24 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
0,0	3	2,1 (1,5-2,7)	1,2 (0,8-1,3)
2,0	2	1,6 (1,1-2,0)	0,9 (0,6-1,2)
3,5	2	2,0 (1,7-2,2)	1,3 (1,2-1,3)
<u>männliche Mäuse; KG 20,4+2,5 g</u>			
<u>Mimosin ip 2, 1 und 0,5 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
0,0/0,0/0,0	2	3,7 (3,3-4,1)	2,3 (2,0-2,6)
2,5/1,25/1,25	2	2,4 (2,4-2,4)	1,9 (1,6-2,1)
<u>männliche Mäuse; KG 21,9+2,5 g; methioninarm ernährt</u>			
<u>Mimosin ip 0 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
0,0	1	4,9	3,4
2,5	1	6,4	2,7
5,0	1	4,8	2,9
10,0	1	2,1	4,0
<u>weibliche Mäuse; KG 33,7+4,0 g; 16 h Futterentzug</u>			
<u>Mimosin po 0 h vor Exposition; t = 4 h</u>			
0,0	2	2,7 (2,4-3,0)	3,8 (1,5-6,2)
2,5	1	1,4	2,1
4,0	1	1,4	2,2
5,0	1	2,0	3,2

(a): Applikationsvolumen 25 ml/kg KG; ip: intraperitoneal;
 KG: Körpergewicht ($\bar{x} \pm s$); n: Versuchsgruppen à 4 Tieren;
 po: oral; t: Expositionszeit im Exsiccator

Der vorstehenden Tabelle läßt sich entnehmen, daß Mimosin weder bei intraperitonealer noch bei oraler Verabreichung die Ethan- und Ethenexpiration der Versuchstiere steigert.

Die an sich leicht erhöhte Ethanexpiration der methioninarm ernährten Tiere (mit Glutathionverarmung) ist der Mimosindosis offenbar umgekehrt proportional.

Eisenionen nach Mimosin. Die Beeinflussung der eisen-induzierten Ethanexspiration der Versuchstiere durch Mimosin geht aus Tabelle 4 hervor.

Tab. 4: Ethan- und Ethenexspiration ($\bar{x}+s_{\bar{x}}$) von Mäusen nach intraperitonealer Mimosin- und subcutaner Eisen(II)-belastung

Dosis	n	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)
<u>männliche Mäuse; KG 26,9+3,8 g; 16 h Futterentzug</u>			
<u>NaCl (a) ip 0,5 h und Fe²⁺ 0 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
<u>Fe²⁺ (mmol in 10 ml pro kg KG)</u>			
0,0	4	2,3+ 0,2	2,1+0,6
0,2	4	27,9+ 4,9	2,1+0,4
0,4	4	62,8+ 7,3	1,8+0,1
0,6	4	125,2+16,9	2,1+0,3
0,8	4	183,3+27,0	2,5+0,3
1,0	4	209,9+10,3	2,7+0,3
<u>männliche Mäuse; KG 21,3+1,4 g; 16 h Futterentzug</u>			
<u>Mimosin 0,5 h und Fe²⁺ (b) 0 h vor Exposition; t = 3 h</u>			
<u>Mimosin (mmol in 25 ml pro kg KG)</u>			
0,0	5	64,0+ 7,3	2,0+0,1
2,5	2	50,5+ 1,2	1,9+0,3
5,0	2	56,5+ 3,7	2,3+0,3
10,0	2	44,8+15,8	2,1+0,1

(a): 3,85 mmol in 25 ml pro kg KG; (b): 0,4 mmol in 10 ml pro kg KG; $s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwertes; übrige Symbole wie Tabelle 3

Tabelle 4 zeigt, daß Eisen(II)ionen bei parenteraler Applikation die Ethanexspiration dosisabhängig steigern und daß Mimosin in hohen Dosen diesen Effekt abschwächt.

Eisen-Mimosingemisch. Die subcutane Verabreichung von 0,25 mmol eines äquimolaren Eisen(II)-Mimosingemisches pro kg Körpergewicht an nüchterne (16 Stunden Futterentzug) 22,8+1,3 g schwere männliche Mäuse ergab bei 4 Versuchsgruppen à 4 Tieren eine Ethanexpiration von 78,2+4,8 und eine Ethenexpiration von 1,9+0,2 nmol pro kg Körpergewicht und 3 Stunden ($\bar{x}+s_{\bar{x}}$).

Ein Vergleich dieses Resultates mit Tabelle 4 ergibt, daß 0,25 mmol Eisen(II)ionen pro kg Körpergewicht in äquimolarem Gemisch mit Mimosin eine doppelt so hohe Ethanexpiration bei den Versuchstieren induzieren als Eisen(II)-ionen ohne Mimosinzusatz (ca. 38 nmol Ethan pro kg Körpergewicht und 3 Stunden).

3.4 Glutathionbestimmung in der Leber

3.4.1 Versuchsdurchführung

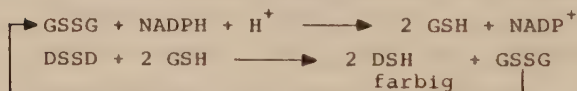
Die Glutathionbestimmung in der Leber erfolgte nach Griffith (1980) und Tietze (1969), wobei die reduzierte (GSH) und die oxidierte Form (GSSG) des Tripeptids erfaßt werden.

Dazu wurde die Leber der mit Diethylether narkotisierten Versuchstiere zur Entfernung des Blutes zunächst mit eiskühler 0,154 molarer Natriumchloridlösung in situ perfundiert. Dann erfolgte die Entnahme einer ca. 1 g schweren Leberprobe. Die Probe wurde 3 mal mit Natriumchloridlösung gespült, an Filterpapier getrocknet, mit der gleichen Gewichtsmenge Trichloressigsäurelösung versetzt und 30 Sekunden lang bei 15000 Upm (Ultra-Turrax, JANKE & KUNKEL KG Staufen) homogenisiert. Der Homogenisierung folgte eine zweimalige Ultrabeschallung von 10 Sekunden Dauer (Sonifier Modell B-12, BRANSON SONIC POWER CO Danbury USA) und eine 15 Minuten lange Zentrifugation mit 17000 g_n (J-21B Centrifuge, BECKMAN München). Vom Überstand wurde 1 ml mit 3 ml Trichloressigsäurelösung gemischt, wie angegeben erneut zentrifugiert und dann 1/101 mit Phosphatpuffer weiterverdünnt.

Im Ansatz zur Glutathionbestimmung sind bei der Testprobe 0,2 ml dieser Verdünnung mit 0,7 ml NADPH-Lösung, 0,1 ml DTNB-Lösung und 1 ml Phosphatpuffer versetzt, 10 Minuten lang bei 30 °C gehalten, mit 0,1 ml Glutathionreduktase-Lösung gemischt und zwei mal im Abstand von 5 Minuten bei 412 nm zur Bestimmung der Extinktionsänderung photometriert worden.

Als Blindprobe diene ein entsprechender Ansatz mit 0,2 ml Phosphatpuffer anstelle der Leberverdünnung.

Zur Bestimmung der Glutathionkonzentration der Leber ist eine Eichkurve mit verschiedenen konzentrierten GSSG-Lösungen anstelle der Leberverdünnung verwendet worden. Dabei wird GSSG zunächst von Glutathionreduktase und NADPH zu GSH reduziert, welches farblores DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure); DSSD) zu der bei 412 nm absorbierenden 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (DSH) reduziert (Tietze 1969):



Die Bildung des absorbierenden Reaktionsproduktes von DTNB ist der GSH-Menge im Ansatz proportional.

Die Eichkurve illustriert die zeitliche Extinktionsänderung (Δ_E ; min^{-1}) bei 412 nm als Funktion der GSSG-Konzentration (C ; $\mu\text{mol/l}$) und läßt sich im Konzentrationsbereich bis ca. 3 $\mu\text{mol/l}$ durch eine Regressionsgerade der Form

$$\Delta_E = a + bC \quad (\text{min}^{-1})$$

beschreiben, wobei $a = -8,6 \cdot 10^{-5}$, $b = 2,9 \cdot 10^{-2}$, der Korrelationskoeffizient $r = 0,998$ und die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme einer signifikanten Korrelation $< 0,001$ ist.

Die Eichkurve ist in Abbildung 4 bis zu einer GSSG-Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ graphisch dargestellt.

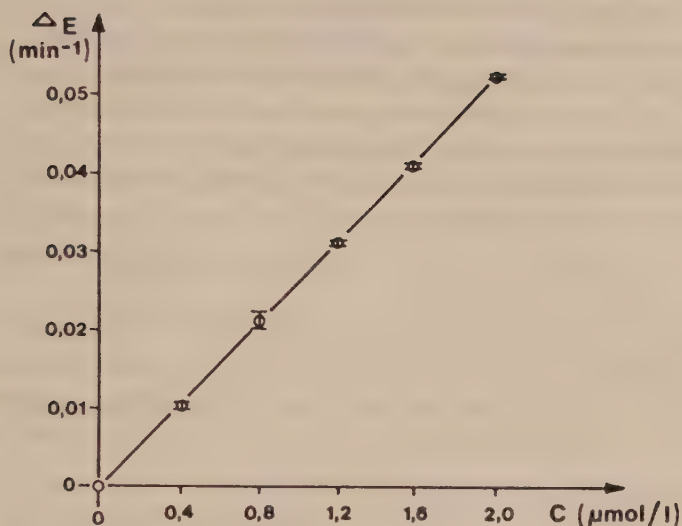


Abb. 4: Eichkurve für GSSG ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Zur Berechnung des Gesamtglutathiongehaltes der Leber als reduziertes Glutathion (GSH) kann nachstehende Formel verwendet werden:

$$C_{Le} = \frac{(\Delta_E - a) \cdot F \cdot U}{b} \quad (\mu\text{mol/l})$$

mit folgender Bedeutung der einzelnen Symbole:

C_{Le} : GSH-Konzentration der Leber ($\mu\text{mol/l}$)

Δ_E : Extinktionsänderung pro Minute bei 412 nm,

a, b: Regressionsparameter bzw. -koeffizient,

F: Verdünnungsfaktor, hier: 808 und

U: Umrechnungsfaktor GSSG/GSH, hier: 1,9934.

Der so berechnete Glutathiongehalt hat die Dimension "Menge pro Lebervolumen"; er kann anhand der spezifischen Dichte der Leber in die gewichtsbezogene GSH-Konzentration der Leber umgerechnet werden.

Bei den durchgeführten Glutathionbestimmungen ist diese Umrechnung nicht erforderlich gewesen, da nur die Glutathionkonzentration in der Leber von behandelten Testtieren *r e l a t i v* zur Konzentration vergleichbarer Kontrolltiere von Interesse war. Die Berechnung der relativen Glutathionkonzentration ($C_{T/K}$; %) ist nach folgender Beziehung vorgenommen worden:

$$C_{T/K} = \frac{10^2 \cdot (\Delta_{ET} - a)}{\Delta_{EK} - a} \quad (\%)$$

/ Δ_{ET} : Δ_E der Testtiere
/ Δ_{EK} : Δ_E der Kontrolltiere

Da der Regressionsparameter a einen sehr kleinen Wert hat, ($- 8,6 \cdot 10^{-5}$; s. oben), kann er bei praktischen Berechnungen ohne großen Fehler vernachlässigt werden.

3.4.2 Ergebnisse der Glutathionbestimmungen

Zur Bestimmung der relativen Glutathionkonzentration von mimosinbehandelten Testtieren ist zunächst die Extinktionsänderung bei weiblichen Kontrollmäusen (Δ_{EK}) mit einem Körpergewicht von $36,7 \pm 4,0$ g ($\bar{x} \pm s$) nach intraperitonealer Verabreichung von 25 ml 0,154 molarer Natriumchloridlösung pro kg Körpergewicht untersucht worden. Das Ergebnis geht aus Tabelle 5 hervor.

Tab. 5: Extinktionsänderung (Δ_{EK}) bei weiblichen Mäusen nach intraperitonealer Natriumchloridapplikation ($\bar{x} \pm s$)

n	t (min)	$\Delta_{EK} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
3	30	0,073 $\pm$ 0,007
3	40-50	0,068 $\pm$ 0,002
3	55-60	0,061 $\pm$ 0,001
2	75	0,074 (0,068-0,080)
2	85-90	0,081 (0,079-0,082)
3	105-110	0,065 $\pm$ 0,015
4	120-140	0,079 $\pm$ 0,006

min: Minuten; t: Zeit zwischen NaCl-Applikation und Leberentnahme

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß die Glutathionkonzentration der Leber im Laufe von 2 Stunden nach intraperitonealer Verabreichung von physiologischer Kochsalzlösung keine signifikante Änderung aufweist.

Daraufhin sind die vorstehenden Ergebnisse wie folgt zusammengefaßt und als Bezugsgröße für die Testergebnisse nach Mimosinbelastung verwendet worden ($\bar{x}+s$):

$$\bar{\Delta}_{EK} = 0,071 + 0,009 \text{ min}^{-1} \text{ bzw. } 100,0 + 13,0 \%$$

Die Untersuchung der Mimosinwirkung auf die Glutathionkonzentration der Leber ist mit weiblichen Mäusen erfolgt, deren mittleres Körpergewicht 35,3+4,0 g betrug ($\bar{x}+s$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Relative Glutathionkonzentration ($C_{T/K}$) in der Leber weiblicher Mäuse nach intraperitonealer Mimosinbelastung ($\bar{x}+s$)

D (mmol/kg)	n	t (min)	$C_{T/K}$ (%)	$\bar{C}_{T/K}$ (%)
2,0	1	30	99	101+6
	1	60	107	
	1	90	96	
2,5	2	35-45	92 (91-93)	103+15
	1	60	83	
	2	80-90	129 (114-143)	
	5	130-140	102+14	
4,0	2	30	75 (73-77)	88+15 (a)
	2	105	100 (95-105)	

(a): Vergleich mit Bezugswert 100 % ergibt $p > 0,1$; $\bar{C}_{T/K}$: $\bar{x}+s$ aller relativen Glutathionkonzentrationen pro Dosis; D: Mimosindosis; n: Tierzahl; t: Zeit zwischen Mimosingabe und Leberentnahme

Aus Tabelle 6 ergibt sich, daß Mimosin in parenteralen Dosen bis 4 mmol/kg Körpergewicht im Laufe von 2 Stunden keine signifikante Beeinflussung des Gesamtglutathiongehaltes der Leber hervorruft.

3.5 Schlußfolgerungen

Insgesamt legen die Untersuchungen von Mimosin auf oxidierende Eigenschaften folgende Schlußfolgerungen nahe:

Mimosin verursacht weder in oralen Dosen bis 5 mmol/kg Körpergewicht noch in intraperitonealen Dosen bis 10 mmol/kg eine Zunahme der Ethan- und Ethenexpiration (Tab. 3). Dies ist auch bei methioninarm ernährten Versuchstieren mit einem erniedrigten Glutathionspiegel der Fall.

In hoher Dosierung senkt Mimosin die Eisen(II)-induzierte Ethanexpiration (Tab. 4). Die parenterale Verabreichung eines äquimolaren Fe^{2+} -Mimosingemisches steigert die Ethanexpiration.

Der Gesamtglutathiongehalt der Leber wird durch intraperitoneale Mimosingaben nicht beeinflusst (Tab. 6).

Die Befunde legen den Schluß nahe, daß Mimosin selbst keine oxidierende Wirkung hat, offenbar jedoch die oxidierenden Eigenschaften von Eisen(II)ionen zu modifizieren vermag.

4 Untersuchung von Mimosin auf chelatbildende Eigenschaften

Die dosisabhängige Modifikation der eiseninduzierten Lipidperoxidation durch Mimosin kann auf einer Beeinflussung der Bioverfügbarkeit und/oder der oxidativen Wirksamkeit von Eisen(II)ionen durch Mimosin beruhen. Als mögliche Ursache kommt eine Chelatbildung in Frage, wobei vorstellbar ist, daß - je nach Anteil der Reaktionspartner - verschiedene Metallkomplexe mit unterschiedlicher Verfügbarkeit bzw. Wirksamkeit gebildet werden.

Zur experimentellen Prüfung dieser Hypothese sind Untersuchungen in vitro und in vivo durchgeführt worden.

4.1 Untersuchungen in vitro

Die Versuche in vitro umfassen

- eine Untersuchung der Absorptionsspektren verschiedener Mimosin-Schwermetallsulfatlösungen im Wellenlängenbereich von 900 bis 190 nm und
- die Bestimmung der molekularen Zusammensetzung des Mimosin-Eisen(II)chelates.

4.1.1 Mimosin-Schwermetallspektren

Methodik. Bei den untersuchten Schwermetallsalzen handelt es sich um $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ purissimum sowie $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und CuSO_4 pro analysi. Die Salze sind von der Fa. MERCK, Darmstadt, bezogen worden. Mimosin war von gleicher Provenienz wie bei den vorangegangenen Versuchen (L-Mimosin, 99 %; s. oben).

Von diesen Verbindungen wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt:

- 1 mg Salz plus 10 ml aqua dest.,
- 1 mg Mimosin plus 10 ml aqua dest. bzw.
- 1 mg Salz plus 1 mg Mimosin plus 10 ml aqua dest..

Zur Aufnahme der Spektren sind die frisch zubereiteten Lösungen 60 Minuten lang bei 50 °C im Wasserbad gehalten, 1/6 mit aqua dest. verdünnt und dann auf 25 °C eingestellt worden. Die Endkonzentration betrug somit bei Mimosin ca. 84 und bei den Metallionen etwa 58 bis 104 µmol/l Meßlösung (a).

Das verwendete Spektrophotometer war ein HITACHI-Gerät, Modell U-3200, und wurde von der Fa. KONTRON in Eching bei München bezogen. Dazu wurden Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Die Messung erfolgte bei einer spektralen Spaltbreite von 2 nm.

Spektren. Die spektrophotometrische Untersuchung des Lösungsmittels und der Schwermetallsulfatlösungen hat zu dem in Abbildung 5 dargestellten Ergebnis geführt.

(a): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 75, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 59, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 58, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60, CuSO_4 104 µmol/l Meßlösung

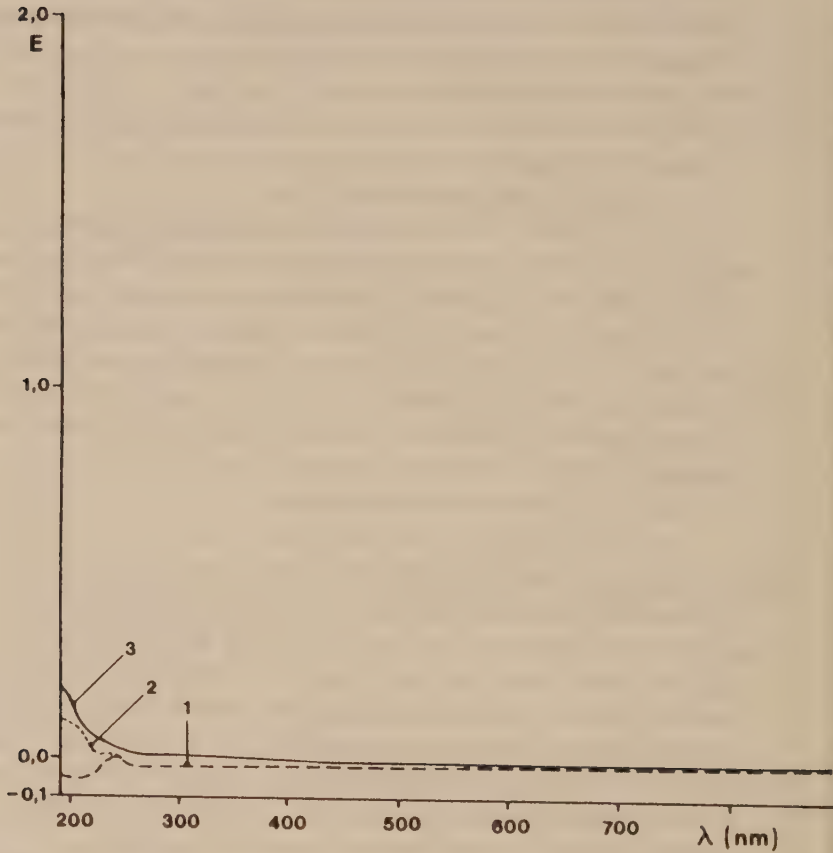


Abb. 5: Absorptionsspektren von aqua dest. (1) und wässrigen Mangan- (1), Cobalt- (1), Zink- (1), Kupfer- (2) und Eisensulfatlösungen (3)

Die Abbildung zeigt, daß weder das Lösungsmittel noch die Schwermetallsalzlösungen charakteristische Absorptionsbanden im untersuchten Wellenlängenbereich aufweisen.

Die nächste Abbildung (Abb. 6) zeigt ein typisches Absorptionsspektrum von Mimosin in aqua dest..

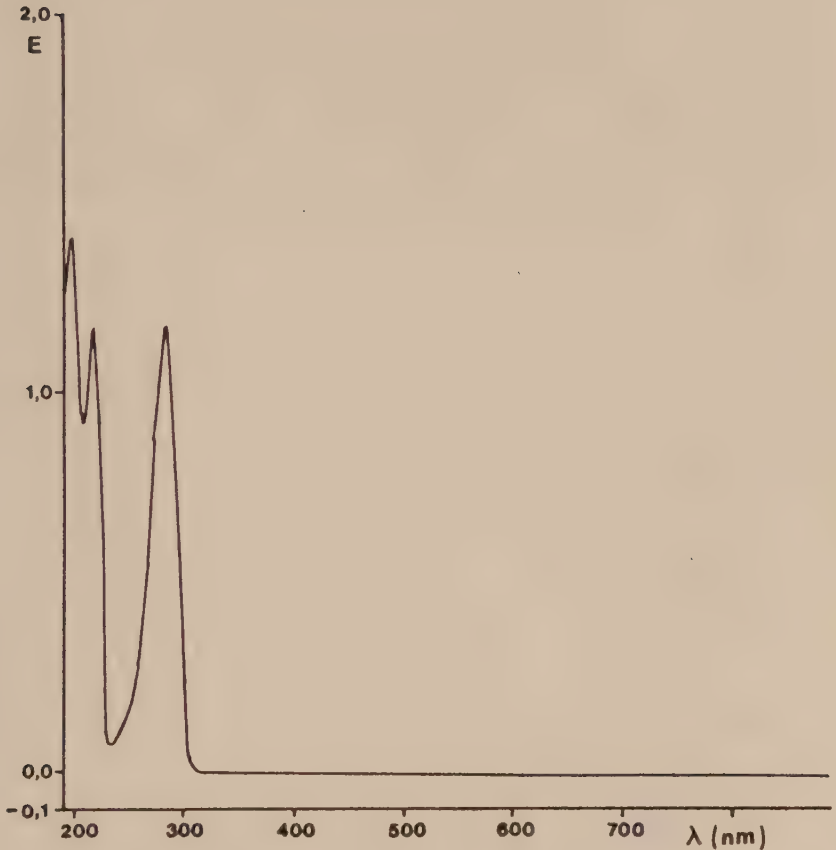


Abb. 6: Absorptionsspektrum einer wässrigen Mimosinlösung

Ein Vergleich von Abbildung 6 mit 5 ergibt, daß Mimosin in wässriger Lösung drei spezifische Absorptionsbanden bei 283, 216 und 195 nm aufweist.

Bei der Herstellung von Mimosin-Schwermetallsalzlösungen ist in zwei Fällen eine auffällige Farbänderung eingetreten: Cupfersulfat ergab mit Mimosin eine schwache grünliche und Eisensulfat eine intensive rot-orange Färbung. Die übrigen Lösungsgemische (Mangan-, Cobalt- bzw. Zinksulfat plus Mimosin) waren farblos.

Die Aufnahme der Spektren lieferte bei den Cupfer- und Eisensulfatgemischen die in Abbildung 7 und 8 dargestellten Absorptionsbanden. Bei den übrigen Schwermetallsulfaten zeigten sich keine typischen Abweichungen vom Mimosinspektrum.

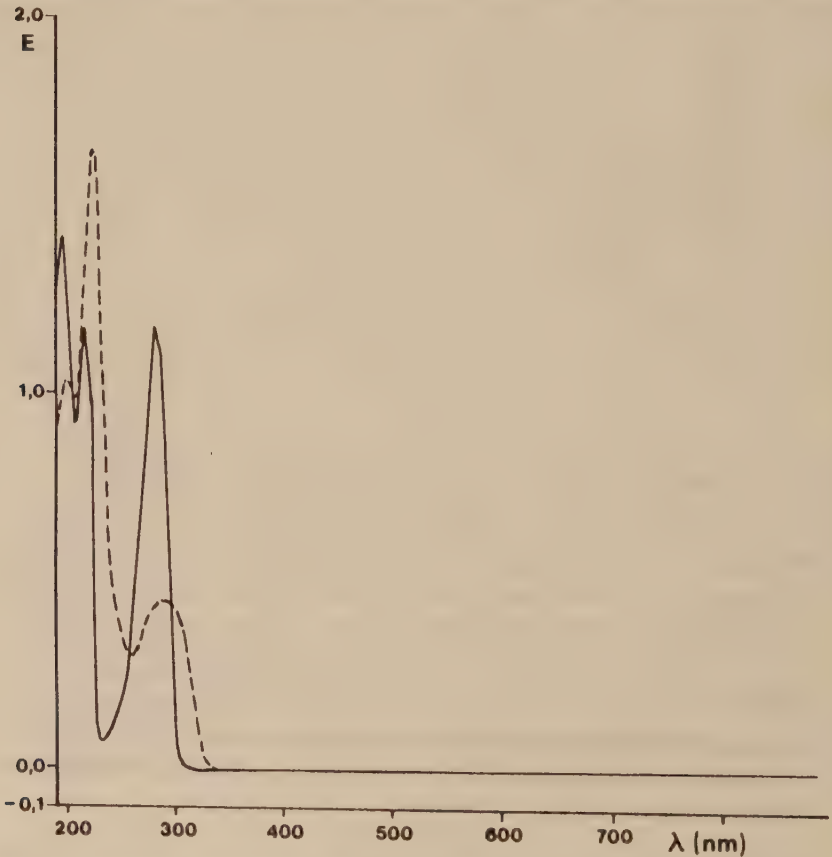


Abb. 7: Absorptionsspektrum einer wässrigen Mimosin-Cupfersulfatlösung (---) und einer Mimosinlösung (—)

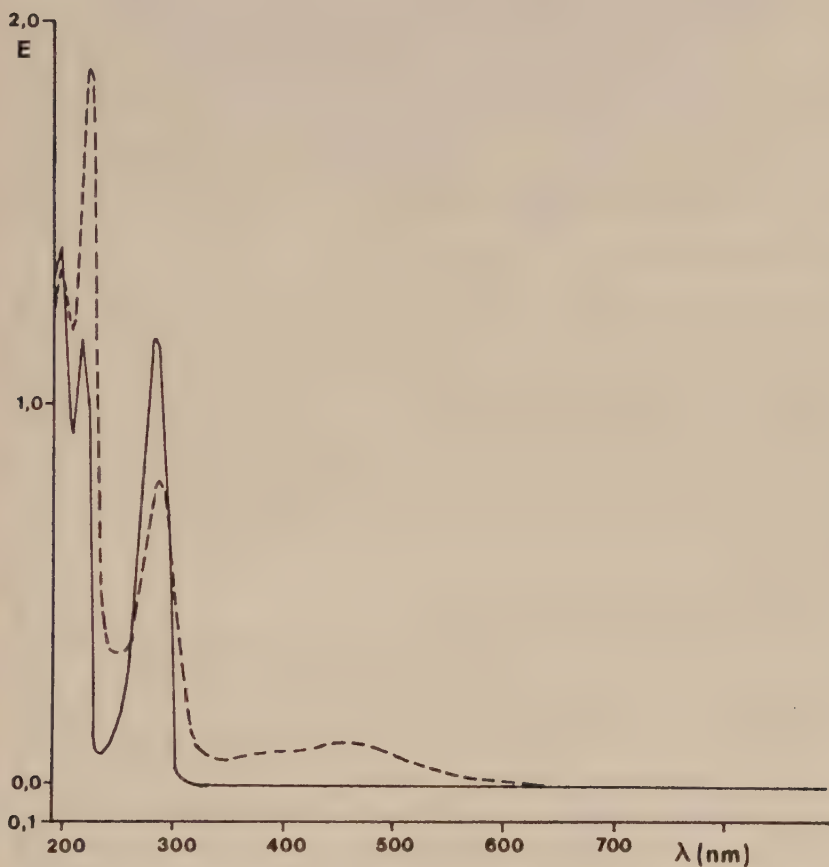


Abb. 8: Absorptionsspektrum einer wässrigen Mimosin-Eisensulfatlösung (---) und einer Mimosinlösung (—)

Abbildung 7 und 8 lassen eine leichte Rechtsverschiebung (nach längerern Wellenlängen) der beiden Mimosin-Schwermetallspektren, eine Abschwächung der Mimosinbanden bei 283 und 195 nm und eine Verstärkung der Bande bei 216 nm erkennen. Dazu kommt bei der Mimosin-Eisensulfatlösung ein flacher Extinktionsanstieg im längerwelligen Bereich mit einem Maximum bei 451 nm.

Schlußfolgerung. Die Mimosin-Schwermetallspektren zeigen im Falle des Cupfer(II)- und Eisen(II)spektrums, daß offensichtlich eine chemische Reaktion zwischen Cupfer bzw. Eisen und Mimosin stattfindet. Dabei ist naheliegend, daß es sich um eine Chelatbildung mit den Schwermetallionen als Zentralatom und Mimosin als Liganden handelt, die sich folgendermaßen beschreiben läßt (Me: Schwermetall, n: 1, 2, 3, ...):



Auch bei den anderen Schwermetallionen (Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) kann eine Chelatbildung mit Mimosin trotz fehlender Farbentwicklung und eines uncharakteristischen Absorptionsverhaltens nicht ausgeschlossen werden, da "... zwar viele Chelate charakteristische Absorptionsspektren haben, viele andere aber farblos sind oder sich in ihren Absorptionsspektren nur unwesentlich von den entsprechenden Metallionen oder auch von den Chelatbildnern (Liganden) unterscheiden." (Martell und Calvin 1958).

4.1.2 Mimosin-Schwermetallchelate

Als Konsequenz der vorstehenden Interpretation der Mimosin-Schwermetallspektren stellt sich die Frage nach der Zusammensetzung der postulierten Chelate.

Zu ihrer experimentellen Untersuchung bietet sich das Mimosin-Eisenchelat an, da sein Spektrum als einziges eine Absorptionsbande aufweist, welche weder im Mimosinspektrum noch im Eisensulfatspektrum nachzuweisen (vgl. Abb. 5 und 6 mit Abb. 8), wahrscheinlich also dem Chelat zuzuordnen ist. Es handelt sich um die Absorption bei 451 nm.

Mimosin-Eisenchelat. Bei der Untersuchung des Mimosin-Eisenchelates war zunächst zu zeigen, daß die genannte Absorptionsbande chelatspezifisch, d. h. der Konzentration des Mimosin-Eisenkomplexes proportional ist.

Wenn man dabei von der o. a. Bildungsgleichung ausgeht, so ist (wegen deren Umkehrbarkeit) zu erwarten, daß die Absorption bei 451 nm nicht nur von der Konzentration des Komplexes, sondern auch vom molaren Mimosin-Eisenverhältnis abhängig ist. Deshalb wurde zunächst diese Abhängigkeit untersucht.

Die Untersuchung ist methodisch wie bei den Spektren beschrieben, durchgeführt worden. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

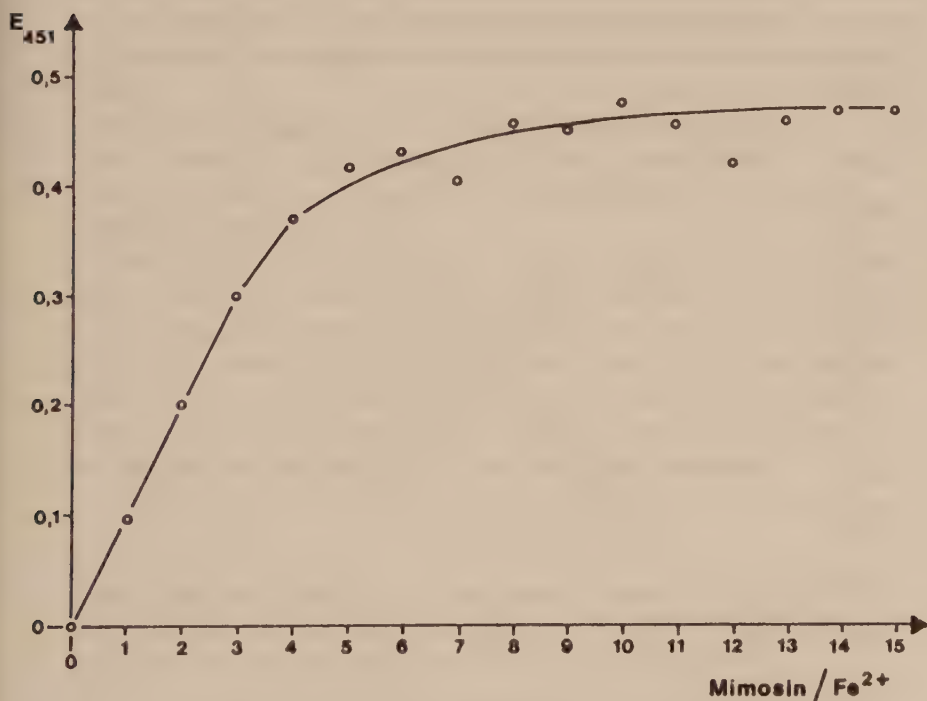


Abb. 9: Absorption bei 451 nm (E_{451}) als Funktion des molaren Mimosin-/ Fe^{2+} -Verhältnisses ($C_{\text{Fe}^{2+}} = 0,09 \text{ mmol/l}$)

Der Abbildung läßt sich entnehmen, daß die Absorption bei 451 nm mit zunehmendem Mimosinüberschuß einem Grenzwert zustrebt und bei einer molaren Relation $\geq 14/1$ praktisch konstant bleibt. Offenbar liegen unter diesen Umständen die Ferroionen weitgehend als Mimosinchelat vor, so daß die Extinktion nur noch der Chelatkonzentration proportional ist und vom Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner unabhängig wird.

Aufgrund dieses Befundes sind verschieden konzentrierte Mimosin-Eisensulfatlösungen unter Wahrung eines molaren Mimosin-/Eisen(II)verhältnisses von 14,5/1 hergestellt und bei 451 nm mit dem in Abbildung 10 dargestellten Ergebnis photometriert worden.

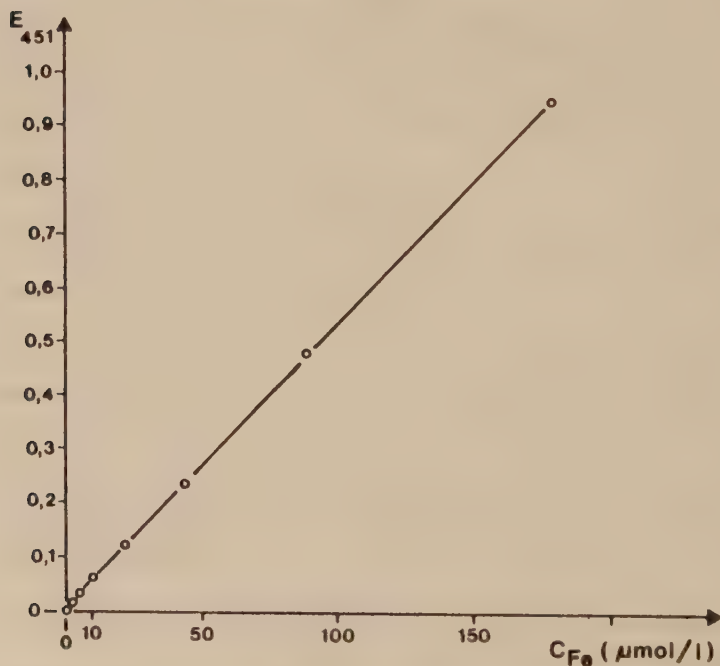


Abb. 10: Absorption des Mimosin-Eisen(II)chelates bei 451 nm (E_{451}) als Funktion der Eisen(II)konzentration (C_{Fe})

Aus Abbildung 10 in Verbindung mit Abbildung 5 und 6 geht hervor, daß die Absorption bei 451 nm im Spektrum von Mimosin-Eisen(II)sulfatlösungen (s. Abb. 8) der Konzentration des Mimosin-Eisenchelates proportional, d. h. chelatspezifisch ist.

Die Z u s a m m e n s e t z u n g des Mimosin-Eisenkomplexes ist nach der "Methode der kontinuierlichen Variation" von JOB (zit. bei Martell und Calvin 1958) bestimmt worden. Das Verfahren kann bei löslichen Chelaten angewandt werden, wenn

- das Chelat ein spezifisches Absorptionsmaximum hat,
- keine weitere Komplexverbindung bei der Reaktion entsteht und
- die molare Gesamtkonzentration der Reaktionspartner - hier: Mimosin als Ligand und Fe^{2+} als Zentralatom - bei der Variation ihrer Anteile im Reaktionsansatz konstant gehalten wird.

Unter diesen Umständen ist die Konzentration des gebildeten Chelats am höchsten, wenn Ligand und Zentralatom in dem molaren Verhältnis zur Reaktion gebracht werden, das der Zusammensetzung des Chelats entspricht. Bei einer Variation der Konzentrationsverhältnisse wird deshalb die der Chelatkonzentration proportionale spezifische Absorption bei 451 nm ein Maximum erreichen, wenn die Bedingung

$$(\text{Fe}^{2+})/(\text{Mimosin}) = 1/n \quad /(): \text{ molare Konzentration}$$

erfüllt ist.

Bei der experimentellen Bestimmung dieses Verhältnisses sind die Konzentrationen von Fe^{2+} und Mimosin unter Beibehaltung einer Gesamtkonzentration (C) von 2 mmol/l:

$$(\text{Fe}^{2+}) + (\text{Mimosin}) = C = 2 \text{ mmol/l} \quad /(): \text{ molare Konzentration}$$

zur Bestimmung der Extinktion bei 451 nm variiert worden.

Zur Herstellung der einzelnen Ansätze wurden Mimosin und Eisen(II)sulfat in 10 ml aqua dest. gelöst, eine Stunde lang bei 50 °C im Wasserbad gehalten und dann zur Extinktionsbestimmung auf eine Temperatur von 25 °C gebracht.

Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

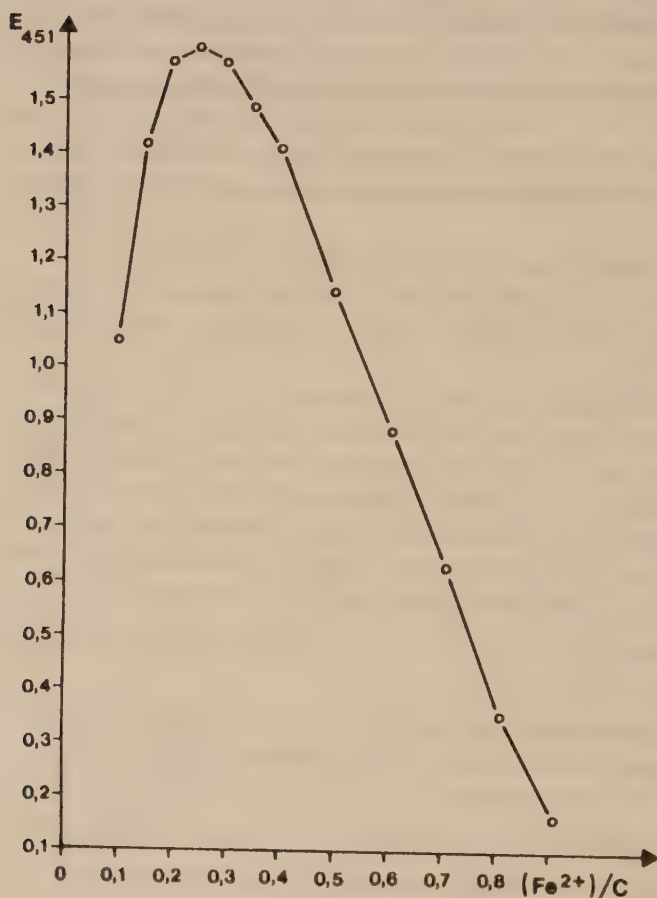


Abb. 11: Absorption einer Mimosin-Eisen(II)sulfatlösung bei 451 nm (E_{451}) als Funktion des molaren Eisenanteils ((Fe^{2+})) an der molaren Gesamtkonzentration (C)

Der vorstehenden Abbildung läßt sich entnehmen, daß die chelatspezifische Extinktion bei 451 nm bei einem molaren Verhältnis $(\text{Fe}^{2+})/\text{C} = 0,25$ ein Maximum durchläuft und daß im ganzen Variationsbereich nur ein Maximum auftritt.

Hieraus errechnet sich der Eisen-bzw. Mimosinanteil des Chelats zu

$$(\text{Fe}^{2+}) / ((\text{Fe}^{2+}) + (\text{Mimosin})) = 0,25 = 1/4 \text{ bzw.}$$

$$(\text{Fe}^{2+}) / (\text{Mimosin}) = 1/3$$

Das Ergebnis besagt, daß das Mimosin-Eisen(II)chelat aus 1 Eisenatom und 3 Mimosinmolekülen aufgebaut ist.

4.2 Untersuchungen in vivo

Die chelatbildenden Eigenschaften von Mimosin in vitro und die renale Ausscheidung der Aminosäure in vivo (Tsai und Ling 1974) legen die Annahme nahe, daß Mimosin die Schwermetallausscheidung über die Nieren beeinflusst.

Zur experimentellen Prüfung dieser Hypothese sind Untersuchungen über den Einfluß von Mimosin auf die renale Eisen-, Zink- und Cupferausscheidung durchgeführt worden.

4.2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren konventionell gehaltene und ernährte männliche weiße Mäuse aus der Zucht des Institutes (s. 2.1), denen 16 Stunden vor dem Versuch das Futter entzogen wurde.

4.2.2 Versuchsdurchführung

Den Mäusen sind bei Versuchsbeginn wässrige Schwermetalllösungen in einem Volumen von 10 ml/kg subcutan, wässrige Mimosinsuspensionen in einem Volumen von 20 ml/kg intraperitoneal und 0,077 molare Natriumchloridlösung in einem Volumen von 20 ml/kg Körpergewicht oral verabreicht worden. Anschließend wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige aus Plexiglas zur quantitativen Uringewinnung eingesetzt.

Nach Ablauf der Versuchsdauer ist der Sammelurin von 5 oder 10 Tieren pro Käfig gewogen und 10 Minuten lang bei 6000 Upm zentrifugiert worden (Laborzentrifuge). Dann wurde der Überstand mit aqua dest. verdünnt, 10 Minuten lang bei 25 °C im Wasserbad gehalten und zur Bestimmung der Schwermetallkonzentration weiterverwendet.

Zur Berechnung der ausgeschiedenen Schwermetallmenge hat folgende Formel Verwendung gefunden:

$$A = \frac{C \cdot V^{-1} \cdot \text{Vol}}{\text{KG}} \quad (\mu\text{mol/kg} \cdot \text{t})$$

deren Symbole nachstehende Bedeutung haben:

A: ausgeschiedene Schwermetallmenge ($\mu\text{mol/kg} \cdot \text{t}$)

C: Schwermetallkonzentration in der Urinverdünnung ($\mu\text{mol/l}$)

KG: Körpergewicht der Versuchstiere eines Stoffwechselkäfigs (kg)

t: Versuchsdauer (h)

V: Urinverdünnung (1/...)

Vol: Urinvolumen (l/t)

4.2.3 Renale Eisenausscheidung

Zur Untersuchung der renalen Eisenausscheidung in Gegenwart von Mimosin ist die Konzentration des Mimosin-Eisenchelates in der Urinverdünnung der Versuchstiere anhand der spezifischen Absorption bei 451 nm und unter Verwendung der Eichkurve von Abbildung 10 bestimmt worden. Dabei war sichergestellt, daß die entsprechende Verdünnung eines Kontrollurins keine Eigenabsorption bei 451 nm aufweist.

Das Ergebnis ist in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Beeinflussung der renalen Eisenausscheidung
von adulten Mäusen (a) durch Mimosin

D_{M1} (mmol/kg)	D_{Fe} (mmol/kg)	A_{Fe} ($\mu\text{g/kg}\cdot 2\text{h}$)
<u>Versuchsgruppe ohne Eisenbelastung</u>		
0,0	0,0	0
0,1	0,0	0
0,2	0,0	45
0,3	0,0	45
0,4	0,0	84
0,5	0,0	101
0,6	0,0	0
0,7	0,0	28
0,8	0,0	22
<u>Versuchsgruppe mit Eisenbelastung</u>		
0,0	0,3	0
0,1	0,3	156
0,2	0,3	335
0,3	0,3	553
0,4	0,3	681
0,5	0,3	670
0,6	0,3	760
0,7	0,3	1067
0,8	0,3	1441

(a): Körpergewicht $32,7 \pm 2,4$ g ($\bar{x} \pm s$); A_{Fe} : ausgeschiedene Eisenmenge in chelierter Form (Sammelurin von je 10 Tieren); D_{Fe} : applizierte Eisendosis in Form von FeSO_4 ; D_{M1} : Mimosindosis; Versuchsdauer: 2h

Der vorstehenden Tabelle läßt sich entnehmen, daß Mimosin die renale Ausscheidung von frei verfügbarem Eisen in chelierter Form dosisabhängig steigert, während eine Ausscheidung des (an Transferrin etc.) gebundenen Eisens durch Mimosindosen der vorstehenden Größenordnung offenbar kaum in Gang gebracht wird.

4.2.4 Renale Zinkausscheidung

Zur Untersuchung der renalen Ausscheidungsbeeinflussung von Zink durch Mimosin ist die Zinkkonzentration in der Urinverdünnung der Versuchstiere mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie unter Verwendung von Eichkurven und inneren Standards bestimmt worden (Additionsverfahren).

Das benützte Spektrophotometer (IL 751 der Fa. INSTRUMENTATION LABORATORY BOSKAMP GMBH in Hersel) ist ein Zweistrahlgerät mit Untergrundkompensation (Deuteriumlampe), das einen Einschlitzbrennerkopf hat und mit einem Acetylen-Luftgemisch betrieben wird.

Die Zinkbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 213,9 nm unter Verwendung einer Zink-Hohlkathodenlampe (Betriebsdaten 620 V, 5 mA) mit einer spektralen Spaltbreite von 1 nm.

Die Ansaugrate der Meßlösung betrug 4 ml/min. Der Nullabgleich erfolgte gegen aqua bidest.. Die Signalthöhe wurde wenigstens 2 mal pro Lösung je 10 Sekunden lang bestimmt und in Form von arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens 20 Meßwerten errechnet.

Zur Bestimmung der Zinkkonzentration sind bei jeder Inbetriebnahme des Spektrophotometers Eichkurven mit Zinksulfatlösungen aufgestellt worden, die auch den Untersuchungsproben in verschiedener Konzentration als innere Standards zugesetzt wurden. Die Konzentration der Meßlösungen (C) ist dann als mittlere Konzentrationsdifferenz (Δ) zwischen der so erhaltenen "Probenkurve" und der Eichkurve errechnet worden (s. Abb. 12):

$$C = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta_i \quad (\mu\text{g/ml})$$

Die Auswertung ist in Abbildung 12 veranschaulicht.

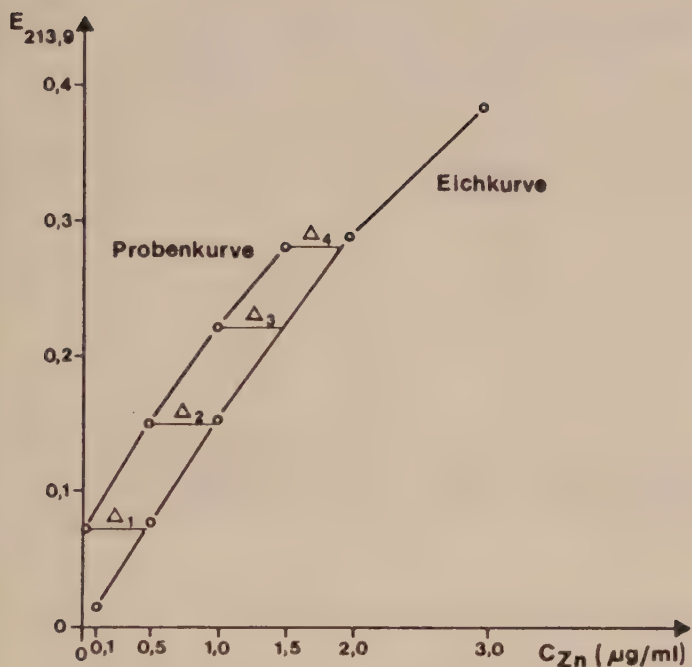


Abb. 12: Zinkbestimmung mittels Eichkurve und inneren Standards zur Ermittlung einer "Probenkurve" (C_{Zn} : Zinkkonzentration; $E_{213,9}$: Extinktion bei 213,9 nm)

Die Beeinflussung der renalen Zinkausscheidung durch Mimosin geht aus Tabelle 8 hervor.

Tab. 8: Beeinflussung der renalen Zinkausscheidung von adulten Mäusen (a) durch Mimosin ($\bar{x}+s$)

D_{Mi} (mmol/kg)	D_{Zn} (mmol/kg)	A_{Zn} ($\mu\text{g/kg}\cdot 4\text{h}$)
<u>Versuchsgruppe mit Zinkbelastung</u>		
0,0	0,3	57+39
0,3	0,3	55+17
0,6	0,3	99+22
0,75	0,3	126+45
0,9	0,3	105+ 9
1,05	0,3	189+37
1,2	0,3	384+22

(a): Körpergewicht 30,1+1,7 g ($\bar{x}+s$); A_{Zn} : ausgeschiedene Zinkmenge (Sammelurin von 2 mal 5 Tieren pro Dosis); D_{Zn} : applizierte Zinkdosis in Form von ZnSO_4 ; D_{Mi} : Mimosindosis; Versuchsdauer: 4h

Tabelle 8 zeigt, daß Mimosin die renale Ausscheidung von frei verfügbarem Zink dosisabhängig steigert.

4.2.5 Renale Cupferausscheidung

Die Untersuchung der renalen Ausscheidungsbeeinflussung von Cupfer durch Mimosin ist analog der Ausscheidungsbeeinflussung von Zink durchgeführt worden (s. oben).

Die Cupferbestimmung in der Urinverdünnung der Versuchstiere erfolgte bei einer Wellenlänge von 324,7 nm unter Verwendung einer Cupfer-Hohlkathodenlampe (Betriebsdaten 620 V, 1 mA) mit einer spektralen Spaltbreite von 1 nm.

Das Untersuchungsergebnis ist in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tab. 9: Beeinflussung der renalen Cupferrausscheidung von adulten Mäusen (a) durch Mimosin ($\bar{x}+s$)

D_{M_1} (mmol/kg)	D_{Cu} (mmol/kg)	A_{Cu} ($\mu\text{g/kg} \cdot 4\text{h}$)
<u>Versuchsgruppe mit Cupferbelastung</u>		
0,0	0,1	- 1+ 19
0,3	0,1	49+ 14
0,6	0,1	55+ 11
0,75	0,1	140+ 85
0,9	0,1	206+ 79
1,05	0,1	224+ 80
1,2	0,1	258+123

(a): Körpergewicht $31,7 \pm 1,1$ g ($\bar{x}+s$); A_{Cu} : ausgeschiedene Cupfermenge (Sammelurin von 2-6 mal 5 Tieren pro Dosis); D_{Cu} : applizierte Cupferdosis in Form von CuSO_4 ; D_{M_1} : Mimosindosis; Versuchsdauer: 4h

Aus Tabelle 9 ergibt sich, daß Mimosin die renale Ausscheidung von frei verfügbarem Cupfer dosisabhängig steigert.

4.3 Schlußfolgerungen

Die Untersuchungen von Mimosin auf chelatbildende Eigenschaften führen zu folgenden Ergebnissen:

Mimosin bildet in vitro und in vivo mit Schwermetallionen wie Fe^{2+} und Cu^{2+} wasserlösliche Chelate.

Das Mimosin-Eisenchelat hat ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 451 nm und besteht aus 1 Eisenatom und 3 Mimosinmolekülen.

Das Mimosin-Eisenchelat, wahrscheinlich auch das -Zink- und -Cupferchelat, ist renal ausscheidbar.

Mimosin verursacht bei Mäusen in parenteralen Dosen von 0,5-1 mmol/kg Körpergewicht und mehr eine dosisabhängige Steigerung der renalen Eisen-, Zink- und Cupferrausscheidung.

IV DISKUSSION

Im folgenden werden die beschriebenen experimentellen Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung des bisherigen Wissensstandes erläutert und interpretiert.

Wirksamkeitsprüfung. Bei Beginn der experimentellen Untersuchungen ist zunächst die Wirksamkeit des im Handel erworbenen Mimosins geprüft worden. Dabei hat sich gezeigt, daß die subchronische orale $LD_{50/14\ Tg}$ für die verwendeten Versuchsmäuse ca. 3 (2 bis 4) mmol/kg bzw. 595 (396 bis 793) mg/kg Körpergewicht beträgt, und daß kein geschlechtsspezifischer Wirkungsunterschied erkennbar ist (Tab. III 2, Seite 34). Aus einem vergleichbaren Versuch von Lin und Ling (1961) läßt sich eine $LD_{100/14\ Tg}$ von ≤ 2000 mg/kg Körpergewicht abschätzen (Seite 13), wobei nicht auszuschließen ist, daß schon eine kleinere Dosis zum Tod aller Versuchstiere geführt hätte. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Wirksamkeit des verwendeten Mimosins und die Empfindlichkeit der gebrauchten Versuchsmäuse mit den in der Literatur berichteten Befunden vergleichbar sind.

Als weiteres Ergebnis hat die Wirksamkeitsprüfung Hinweise auf den Wirkungstyp des Mimosins erbracht. Tabelle III 2 (Seite 34) zeigt nämlich, daß die Wirkung (Sterblichkeit) nicht nur von der täglichen Mimosindosis, sondern (bei gleicher Dosis) auch von der Zeit abhängig ist. Dies ist u. a. von Giften bekannt, deren Effekt auf einer Verarmung an körpereigenen Wirkstoffen beruht. Ein bekanntes Beispiel sind rodenticide Dicumarol- und Indandionderivate. Sie hemmen die Biosynthese verschiedener Blutgerinnungsfaktoren (Faktor VII, IX und X) und verursachen erst dann Vergiftungssymptome, wenn die vorhandenen Gerinnungsfaktoren im Laufe der Zeit verbraucht sind (Osweller et al 1985).

Oxidationswirkung. Eine oxidative Schädigung zellulärer und subzellulärer Membranlipide (Abb. II 5, Seite 26) sowie sonstiger oxidationsempfindlicher Strukturen (Nucleinsäuren, Proteine etc.) des Organismus wurde als molekularer Wirkungsmechanismus von Mimosin aus verschiedenen Gründen in Erwägung gezogen:

Zunächst eröffnet die Struktur des Mimosinmoleküls die Möglichkeit einer metabolischen Radikalbildung, wie sie in Abbildung II 4 (Seite 25) erläutert ist. Freie Radikale sind in der Regel aggressive kurzlebige Intermediate mit starker Oxidationswirkung (Demopoulos 1973).

Ein weiterer, gleichfalls strukturbedingter Grund war die mögliche metabolische Konjugation von Mimosin mit Glutathion, wie sie in Abbildung II 6 (Seite 27) dargestellt ist. Diese Metabolisierungsreaktion wurde von Chassaud (1976) ausführlich beschrieben und hat in neuerer Zeit insofern zusätzliches Interesse gefunden, als die bei der Mercaptursäurebildung aus solchen Konjugaten entstehenden Cysteinderivate durch C-S-Lyasen zu toxischen Thiolen sowie reaktionsfähigen Sulfen- und Sulfinssäurederivaten umgesetzt werden können (Bakke und Gustafsson 1984).

Durch den Glutathionverbrauch kann es nicht nur zu Störungen der Fremdstoffmetabolisierung kommen (Orrenius und Moldéus 1984), sondern auch zu einer Verarmung an intrazellulären Reduktionsäquivalenten mit eingeschränkter Inaktivierung oxidierender Radikale und (via Glutathion-Peroxidase - EC 1.11.1.9) Peroxide (Younes und Siegers 1980).

Der dritte Grund für die Vermutung einer oxidativen Schädigung von Mimosin war die bei allen Tierarten mehr oder weniger bekannte Schädigung schnell wachsender Gewebe wie Haarfollikel, Epithelien des Verdauungskanals und der Blase, Embryonen usw. (s. II 5 Vergiftungsbild, Seite 15 ff.). Dies ist ein Syndrom, das besonders gut bei strahleninduzierten Radikalwirkungen bekannt ist (Tempel 1983).

Im Gegensatz zu diesen Überlegungen, zeigen die experimentellen Ergebnisse, daß intraperitoneal verabreichtes Mimosin weder zu einem freien Radikal metabolisiert wird bzw. eine Lipidperoxidation hervorruft (Tab. III 3, Seite 42/43), noch eine Glutathionverarmung der Leber verursacht (Tab. III 6, Seite 49). Es entsteht vielmehr der Eindruck, daß hohe Mimosindosen die von Ferroionen induzierte Radikalbildung bzw. Lipidperoxidation (Schmid und Christoph 1980) hemmen (Tab. III 4, Seite 44).

Die naheliegendste Erklärung für diese Hemmung ist eine Inaktivierung der Ferroionen durch Mimosin, das mit Metallionen - darunter auch Fe^{2+} (Hashiguchi und Takahashi 1977; Tang und Ling 1975) - Chelate, d. h. Komplexverbindungen bildet (s. II 2 Chemie, Seite 6/7). Dafür spricht nicht zuletzt, daß die Hemmung mit der Mimosindosis zunimmt (Tab. III 4, Seite 44), wie dies nach dem Massenwirkungsgesetz zu erwarten ist.

Bei einer Chelatbildung werden nicht nur die beteiligten Metalle, sondern auch Mimosin gebunden und dadurch ggf. anderen biochemischen Reaktionen, z. B. einer Radikalbildung oder Glutathionkonjugation, entzogen. Die Reaktion mit körpereigenen Metallionen mag deshalb ein Grund sein für das Ausbleiben der erwarteten Lipidperoxidation bzw. Glutathionverarmung bei den durchgeführten Versuchen (Tab. III 3, Seite 42/43 und Tab. III 6, Seite 49). Ein weiterer Grund könnte in der *p a r e n t e r a l e n* Verabreichung von Mimosin bestehen, das von Wiederkäuern bei Umgehung des Verdauungskanals nur geringgradig metabolisiert wird (Hegarty et al 1964b) und von Mäusen offenbar nicht zu Radikalen reduziert werden kann. Im reduzierenden Pansenmilieu (Giesecke und Henderickx 1973) kann diese Möglichkeit jedoch nicht a priori ausgeschlossen werden.

Chelatbildung. Bei den Untersuchungen auf chelatbildende Eigenschaften ist zunächst ein Mimosinspektrum erhalten worden (Abb. III 6, Seite 53), dessen Absorptionsmaximum bei 283 nm auch von Hashiguchi und Takahashi (1977) angegeben wird. Nicht erwähnt sind die beiden Maxima bei 216 und 195 nm, da die Untersuchungen der gen. Autoren bei 220 nm abgebrochen wurden.

Auch das Mimosin-Cupfer(II)- und Mimosin-Eisen(II)spektrum stimmt bei Hashiguchi und Takahashi (1977) in dem von ihnen untersuchten Wellenlängenbereich (350 bis 220 nm) mit den eigenen Spektren (Abb. III 7, Seite 54 und Abb. III 8, Seite 55) überein. Das Absorptionsverhalten außerhalb dieses Bereiches, insbesondere das spezifische Absorptionsmaximum des Mimosin-Eisen(II)chelates bei 451 nm (Abb. III 8, Seite 55), ist bislang nicht beschrieben.

Das unter dem Mimosinspektrum liegende Mimosin-Zinkspektrum von Hashiguchi und Takahashi (1977) ist bei den eigenen Untersuchungen nicht vom Mimosinspektrum differenziert worden (s. Seite 54).

Die Zusammensetzung der Mimosin-Schwermetallkomplexe ist exemplarisch beim Mimosin-Eisen(II)chelate untersucht worden (Seite 56 ff.). Voraussetzung war dabei die Bestimmbarkeit der Chelatkonzentration. Sie ist möglich geworden durch das Auffinden der spezifischen Absorption des Mimosin-Eisen(II)-chelates bei 451 nm (Abb. III 8, Seite 55): Abbildung III 10, Seite 58 zeigt, daß hier die Extinktion der Chelatkonzentration linear proportional ist.

Die Zusammensetzung des Chelates ist nach der von JOB beschriebenen "Methode der kontinuierlichen Variation" (hier: des Mimosin-Eisen(II)-Verhältnisses) ermittelt worden. Dabei darf sich im Reaktionsansatz nur ein Komplex bilden, welcher bei der chelatspezifischen Wellenlänge (hier: 451 nm) absorbiert. Die Variation der Reaktionspartner darf m. a. W. nur ein Maximum ergeben. Abbildung III 11, Seite 60 zeigt, daß diese Anwendungsvoraussetzung erfüllt war.

Die Untersuchung hat zu dem Ergebnis geführt (Auswertung s. Seite 61), daß das Mimosin-Eisen(II)chelate aus einem Eisenatom (als Zentralatom) und 3 Mimosinmolekülen (als Liganden) gebildet wird. Als wahrscheinlichste Struktur des Chelates wird der in Abbildung 13 dargestellte Aufbau vorgeschlagen.

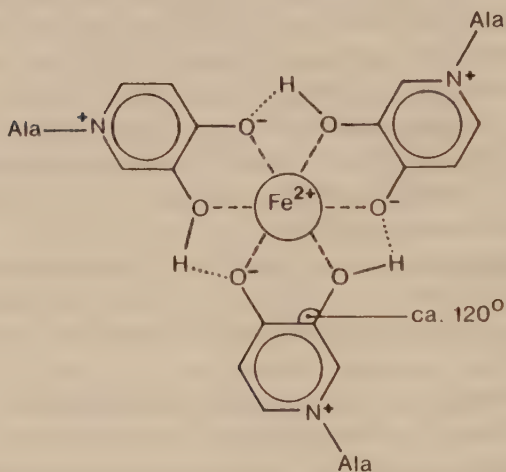


Abb. 13: Mögliche Struktur des Mimosin-Eisen(II)chelates
(Ala: Alaninrest; ---: koordinative Bindung;
.....: Wasserstoffbrückenbindung)

Bei der postulierten Struktur hat das Eisenion die Koordinationszahl 6 und Mimosin ist ein zweizähniger Ligand. Darüber hinaus wird der Komplex durch Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Sauerstoffatomen stabilisiert.

Für diese Struktur sprechen folgende Gesichtspunkte:

a) In Eisen(II)komplexen hat das Ferroion am häufigsten die Koordinationszahl 6 (Martell und Calvin 1958).

b) Eine Chelatbildung durch Sauerstoffatome erfolgt im allgemeinen nur dann, wenn sich ein spannungsfreier Fünf- oder Sechsring bilden kann (Albert 1979; Jander und Blasius 1976), wobei Fünfringe wesentlich stabiler sind (Albert 1979).

Bei der vorgeschlagenen Struktur bildet das Ferroion mit je zwei koordinierten Sauerstoffatomen und dem entsprechenden Pyridinring drei spannungsarme Fünfringe, da die Bindungswinkel der Sauerstoffatome mit dem Pyridinring (s. Abb. III 13, Seite 72) ca. 120° (Mostad et al 1973) und die Innenwinkel eines regelmäßigen Fünfeckes 108° betragen.

c) Eine Chelierung des positiv geladenen Ferroions durch die Sauerstoffatome am Pyridinring wird durch deren phenolischen Charakter (Mostad et al 1973), d. h. ihre negative Ladung bei Abdissoziation eines Protons, begünstigt.

Wegen gleichnamiger Ladungen scheidet dagegen eine Beteiligung der beiden Stickstoffatome des Mimosins an der Chelatbildung mit Fe^{2+} aus, da der Ringstickstoff sein freies Elektronenpaar zur Aromatisierung des Pyridinringes abgibt (Mostad et al 1974) und dann ebenso positiv geladen ist wie der protonierte Stickstoff des Alaninrestes (Mostad et al 1974).

Man kann sich die Frage stellen, ob das leicht oxidierbare Ferroion (Fe^{2+}) von Mimosin nicht in dreiwertiger Form (Fe^{3+}) als Eisen(III)chelate gebunden wird? Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch das Fehlen der für Mimosin-Eisen(III)-komplexe typischen Absorptionsbande bei 535 nm (Megarrity 1978) im Spektrum des untersuchten Mimosin-Eisenchelates (s. Abb. III 8, Seite 55).

Eine andere wichtige Frage betrifft die Bildung weiterer Mimosin-Schwermetallkomplexe. Aufgrund vergleichbarer Ionenradien ($\text{Fe}^{2+} = 0,074$, $\text{Zn}^{2+} = 0,074$, $\text{Cu}^{2+} = 0,072$, $\text{Co}^{2+} = 0,072$ nm; Jander und Blasius 1976), eigener Spektren (Abb. III 7,

Seite 54) und eines Teilspektrums der Mimosin-Zinkverbindung von Hashiguchi und Takahashi (1977) ist eine Chelatbildung mit Zn^{2+} und Cu^{2+} sehr wahrscheinlich und kann bei weiteren Schwermetallionen nicht ausgeschlossen werden. Die Struktur des Zink- und Kupfer(II)chelates dürfte der Struktur des Eisen(II)chelates (Abb. III 13, Seite 72) mit der Einschränkung vergleichbar sein, daß Zn^{2+} und Cu^{2+} in der Regel die Koordinationszahl 4 haben (Martell und Calvin 1958), vermutlich also Chelate mit zwei Mimosinmolekülen bilden.

Schwermetallausscheidung. Ein weiteres Argument für die Komplexbildung von Mimosin mit Fe^{2+} -, Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen sind die durchgeführten Ausscheidungsversuche (Seite 61 ff.). Sie zeigen (Tabellen III 7, Seite 63; III 8, Seite 66 und III 9, Seite 67), daß die drei Schwermetalle proportional zur Mimosinbelastung der Versuchstiere renal ausgeschieden werden, obwohl die Nieren kein physiologisches Ausscheidungsorgan für diese Ionen darstellen (Carson et al 1986; Männer und Bronsch 1987; Underwood 1977), auch nicht bei parenteraler Applikation (Daunderer 1981; Underwood 1977). Dagegen ist ihre renale Ausscheidung in Form wasserlöslicher Chelate, z. B. als Deferoxamin- (Fe^{3+}) bzw. D-Penicillaminchelate (Zn^{2+} , Cu^{2+}), gut bekannt und wird bei den betreffenden Schwermetallvergiftungen therapeutisch genutzt (Henschler 1987; Stand et al 1962; Underwood 1977; Wirth und Gloxhuber 1985).

Obwohl die drei Mimosinchelate angesichts ihrer renalen Ausscheidbarkeit relativ stabil sein müssen, geht aus Tabelle III 7, Seite 63, hervor, daß Mimosin vor allem freie Ferroionen cheliert, während körpereigenes, z. B. als Transferrin oder Ferritin vorliegendes, dreiwertiges Eisen von Mimosin offenbar nur wenig gebunden und zur Ausscheidung gebracht wird.

Wirkungsmechanismus. Insgesamt stützen die Ausscheidungsversuche sowie die übrigen experimentellen Ergebnisse folgende Vorstellungen über die toxikologische Wirkungsweise von Mimosin:

- a) Mimosin bildet mit Fe^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} - wahrscheinlich auch anderen Schwermetallionen - wasserlösliche, nierengängige Chelate.
- b) Die Bildung der Schwermetallchelate und ihre leichte renale Ausscheidbarkeit verursacht bei Daueraufnahme von Mimosin eine Verarmung des Organismus' an lebenswichtigen Schwermetallen, welche die Zeitabhängigkeit der Mimosinwirkung erklärt.

Zur Entwicklung von Schwermetall-Mangelzuständen mag auch eine Resorptionsverschlechterung mit vermehrter enteraler Ausscheidung der chelierten Metalle (Tsai und Ling 1974) beitragen, da die Schwermetallresorption aus dem Verdauungskanal ein aktiver Transportvorgang ist (Underwood 1977), der durch eine Komplexierung der Schwermetallionen offenbar gestört wird.

Ein weiterer synergistischer Effekt könnte die eingeschränkte Bioverfügbarkeit der chelierten Schwermetalle sein.

- c) Besondere Bedeutung bei der mimosinbedingten Schwermetallverarmung scheint dem Zinkmangel zuzukommen, da sich die Vergiftungssymptome von Mimosin bei Rindern durch eine Supplementierung des Futters mit Eisen-, Kupfer- und Zinksalzen, nicht jedoch Eisen-, Kupfer- und Cobaltsalzen bessern lassen (Jones et al 1978).

Dazu kommt, daß folgende Symptome der Mimosinvergiftung auch bei Zinkmangelzuständen bekannt sind: Wachstumshemmung, Haarausfall, Epithelschäden, Fruchtbarkeitsstörungen, Fruchtresorptionen und erhöhte Mißbildungsrate (Underwood 1977) sowie eine gestörte Nucleinsäuren- und Proteinbiosynthese (Dressler 1971; Kirchgeßner 1985; Männer und Bronsch 1987;

Underwood 1977) infolge Hemmung von DNA- und RNA-Polymerasen und der Thymidinkinase (Carsson et al 1986; Daunerer 1981). Darüber hinaus ist Zink essentieller Bestandteil von mehr als 70 Enzymen (Daunerer 1981), deren Aktivität bei Zinkmangel gehemmt wird. Ein Beispiel ist die Hemmung der Alkalischen Phosphatase, die auch bei der Mimosinvergiftung eine erniedrigte Aktivität aufweist (El-Harith et al 1981).

Abgesehen von Zink, dürften auch andere Schwermetallmangelzustände an der Mimosinvergiftung beteiligt sein. Beispielsweise führt eine Eisen(III)verarmung durch lange Anwendung von Deferoxamin ebenso zu einer Linsentrübung wie Mimosin (Forth und Rummel 1987).

Schlußfolgerung. Als praktisch wichtigste Konsequenz aus dem dargelegten Wirkungsmechanismus des Mimosins ergibt sich eine Supplementierung des Futters mit essentiellen metallischen Spurenelementen, insbesondere mit löslichen Zinksalzen. Dadurch sollte es möglich sein, einer Mimosinvergiftung vorzubeugen bzw. eine bestehende Vergiftung zu bessern.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden experimentelle Untersuchungen über den molekularen Wirkungsmechanismus von Mimosin berichtet. Dabei handelt es sich um eine toxische α -Aminosäure aus Mimosengewächsen, vor allem *Leucaena leucocephala*, die in tropischen und subtropischen Gebieten eine wichtige Rolle als Futterpflanze für landwirtschaftliche Nutztiere spielt.

Die Untersuchungen umfassen Versuche *in vitro* und *in vivo*, wobei als Versuchstiere überwiegend konventionell ernährte und gehaltene männliche und weibliche Mäuse aus der Zucht des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie verwendet wurden.

Die wichtigsten Ergebnisse und Konsequenzen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- a) Die LD_{50} des verwendeten L-Mimosins betrug für die Versuchstiere bei 14tägiger intragastraler Applikation ca. 3 mmol/kg Körpergewicht und Tag.
- b) Die toxischen Mimosinwirkungen bestanden in Wachstums-
hemmung, Abnahme des Körpergewichtes und Todeseintritt; sie waren zeit- und dosisabhängig.
- c) Mimosin beeinflusst bei intraperitonealer Applikation in toxikologisch wirksamer Dosierung weder die spontane Ethan- und Ethenexpiration, noch den Glutathiongehalt der Leber. Es verursacht *in vivo* keine Oxidationswirkung, sondern hemmt die Lipidperoxidation parenteral verabreichter Eisen(II)ionen dosisabhängig.
- d) Die Inaktivierung der Eisenionen beruht auf einer Chelatbildung mit Mimosin.

Das Mimosin-Eisen(II)chelate hat eine spezifische Absorptionsbande bei 451 nm. Es ist wasserlöslich und besteht aus einem Eisenatom (als Zentralatom) und drei Mimosinmolekülen (als Liganden). Die chemische Struktur wird vorgeschlagen und begründet (Seite 72 und 73).

e) Mimosin bildet wahrscheinlich auch mit anderen Schwermetallionen, vor allem Zink- und Cupfer(II)ionen, wasserlösliche Chelate.

f) Freie Eisen(II)-, Zink- und Cupfer(II)ionen werden in Gegenwart von Mimosin *r e n a l* ausgeschieden. Die Ausscheidung ist der Mimosindosis proportional.

g) Als toxikologische Molekularwirkung von Mimosin wird eine Verarmung des Organismus an essentiellen metallischen Spurenelementen vorgeschlagen, die auf einer verminderten Resorption der chelierten Schwermetalle aus dem Verdauungskanal, vor allem aber ihrer effektiven renalen Ausscheidung beruht und durch eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit der Metalle verstärkt werden mag. Dabei scheint die Zinkverarmung die größte toxikologische Bedeutung zu haben, da die Zinkmangelsymptome sich weitgehend mit den Symptomen der Mimosinvergiftung decken.

h) Als praktische Maßnahme zur Verhütung und Behandlung der Mimosinvergiftung wird eine Supplementierung des Futters mit essentiellen metallischen Spurenelementen, vor allem löslichen Zinksalzen, angeregt.

STUDIES ON THE TOXICOLOGICAL MODE OF ACTION OF MIMOSINE

SUMMARY

The present work reports on experimental investigations concerned with the molecular mode of action of mimosine. A toxic α -amino acid, mimosine is found in mimosa plants, especially *Leucaena leucocephala*, a forage plant for productive livestock widely used in the tropics and subtropics.

The investigations include experiments in vitro and in vivo, using male and female mice bred by the institute of pharmacology, toxicology and pharmacy, most of the animals being conventionally fed and kept.

The most important results and conclusions are summarized as follows:

- a) The LD_{50} of the L-mimosine used, was determined to be approximately 3 mmol/kg bodyweight and day for daily intragastric administration over a period of 14 days.
- b) The toxic effects observed were growth retardation, loss of bodyweight and exitus, the effects increasing with the dose of mimosine administered and the time of administration.
- c) Administered intraperitoneally in toxicological effective doses, mimosine has no influence on the spontaneous ethane and ethene expiration or the glutathione concentration in the liver. Mimosine has no oxidative effect in vivo, but inhibits the lipid peroxidation of parenterally administered ferrous ions, the degree of inhibition varying with the dose administered.
- d) The inactivation of the ferrous ions is a result of the chelation with mimosine.

The mimosine-iron(II) chelate exhibits a specific absorption band at 451 nm. The chelate is water-soluble and consists of one iron atom (as central particle) and three molecules of mimosine (as ligands). The chemical structure is proposed and expounded on pages 72 and 73.

e) Mimosine is believed to form water-soluble chelates also with ions of other heavy metals, especially with zinc and cupric ions.

f) In the presence of mimosine, free ferrous, zinc and cupric ions are excreted via the kidney. The amount of excretion is proportionally related to the dose of mimosine administered.

g) Regarding the toxicological mode of action, mimosine is believed to cause depletion of metallic trace elements in the organism, the depletion being due to decreased absorption of chelated heavy metals in the digestive tract and, above all, to an effective renal excretion, possibly aggravated by decreased bio-availability of the metals. Toxicologically, the depletion of zinc is most significant, because the signs of zinc deficiency are largely identical with the signs of mimosine poisoning.

h) Supplementation of the feed with essential metallic trace elements, particularly soluble zinc salts, is proposed as a practical measure to prevent and treat mimosine poisoning.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Acamovic T, D'Mello JPF, Fraser KW

Determination of mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone in Leucaena, avian excreta and serum using reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography
J Chromatogr 236, 169-179, 1982

Albert A

Selective toxicology, 6th ed
London: Chapman and Hall 1979

Anderson JW, Fowden L

Properties and substrate specificities of the phenylalanyl-transfer-ribonucleic acid synthetases of Aesculus species
Biochem J 119, 677-690, 1970

Bakke J, Gustafsson JA

Mercapturic acid pathway metabolites of xenobiotics: Generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation
Trends Pharmacol Sci 5, 517-521, 1984

Beuter W, Schmid A, Mayring L

Glutathionverarmung in der Leber von Mäusen durch α,β -ungesättigte Carbonyle und deren Konsequenzen für die Fe(II)-induzierte Lipidperoxidation
Arch Pharmacol 329(S), R 20 NR 77, 1985

Bonting jr SL, Schepan FR

Polarographic investigation of mimosine
Rec Trav Chim Pays Bas 69, 1007, 1950

Borchardt RT

Catechol-O-Methyl transferase. 4. In Vitro inhibition by 3-hydroxy-4-pyrones, 3-hydroxy-2-pyridones, and 3-hydroxy-4-pyridines
J Med Chem 16, 581-583, 1973

Brewbaker JL, Plucknett DL, Gonzalez V

Varietal variation and yield trials of Leucaena leucocephala in Hawaii
Res Bull Hawaii Agric Exp Stat 1972, p 166

Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E

Role of iron in bacterial infection
Current Topics Microbiol Immunol 80, 1-35, 1978

Carson Bonnie L, Ellis HV, McCann Joy L
Toxicology and biological monitoring of metals in humans,
1st ed
Chelsea: Lewis Publishers 1986

Chang LT
The effect of mimosine on alkaline phosphatase of mouse
kidney
J Formosan Med Ass 59, 882-887, 1960

Chasseaud LF
Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion
In: Arias IM, Jakoby WB eds
Glutathione: metabolism and function VI
New York: Raven Press 1976

Clarke Myra L, Harvey DG, Humphreys DJ
Veterinary toxicology, 2nd ed
London: Baillière Tindall 1981

Cohen G
Lipid Peroxidation: detection in vivo and in vitro through
the formation of saturated hydrocarbon gases
In: Ciba Foundation Symposium 65
Oxygen free radicals and tissue damage
Amsterdam: Excerpta Medica 1979

Crounse RG, Maxwell JD, Blank H
Inhibition of growth of hair by mimosine
Nature 194, 694-695, 1962

Daunderer M
Toxikologische Enzyklopädie; Klinische Toxikologie Bd III
Landsberg/Lech: ecomed verlagsgesellschaft 1981

Demopoulos HB
The basis of free radical pathology
Fed Proc 32(8), 1859-1861, 1973

D'Mello JPF, Acamovic T
Growth performance of, and mimosine excretion by, young
chicks fed on *Leucaena leucocephala*
Anim Feed Sci Techn 7, 247-255, 1982

D'Mello JPF, Taplin DE
Leucaena leucocephala in poultry diets for the tropics
World Rev Anim Prod 24, 41-47, 1978

D'Mello JPF, Thomas D
The nutritive value of dried *leucaena* leaf meal from
Malawi: studies with young chicks
Trop Agric (Trinidad) 55(1), 45-50, 1978

Dressler D

Mineralische Elemente in der Tierernährung, 1te Aufl
Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag 1971

El-Harith EA, Scharf Y, ter Meulen U

Reactions of rats fed on *Leucaena leucocephala*
Trop Anim Prod 4, 162-167, 1979

El-Harith EA, Mohme H, ter Meulen U, Bartha Monika, Günther KD
Effects of mimosine on some serum enzyme activities and amino
acid metabolism in the rat

Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 46, 255-263, 1981

El-Harith EA, Hiller Angelika, ter Meulen U

The effect of administration of glycine and tyrosine on the
growth depression caused by mimosine in rats

Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 50, 132-137, 1983

Falvey L

The effect of *Leucaena leucocephala* on cattle in the Northern
Territory

Aust Vet J 52, 243, 1976

Forth W, Rummel W

Pharmakologische Beeinflussung der großen Verdauungsdrüsen
und des Darmtraktes

In: Forth W, Henschler D, Rummel W Herausgeber

Pharmakologie und Toxikologie, 5te Aufl

Mannheim: BI Wissenschaftsverlag 1987

Frohne D, Jensen U

Systematik des Pflanzenreiches, 2te Aufl

Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1979

Frohne D, Pfänder HJ

Giftpflanzen, 2te Aufl

Stuttgart: Wiss Verlagsges 1983

Giesecke D, Henderickx HK

Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung

München: BLV Verlagsges 1973

Griffith OW

Determination of glutathione and glutathione disulfide
using glutathione reductase and 2-vinylpyridine

Analyt Biochem 106, 207-212, 1980

Grove JA, Ballata PD, Eastmo V, Hwang LR

Studies on the metabolic effects of mimosine

Nutr Rep Intern 17, 629-636, 1978

Hashiguchi H, Takahashi H
Toxicity of L-mimosine and its chelate forming nature
with metal ions

Kumamoto Med J 30(3), 101-110, 1977

Hathcock JN, Labadan MM

Toxicity of mimosine and *Leucaena leucocephala* extracts
to chicken embryos

Nutr Rep Intern 11(1), 63-69, 1975

Hegarty MP

Toxic amino acids of plant origin

in: Keeler RF, van Kampen KR, James Lynn F eds

Effects of poisonous plants on livestock

New York: Academic Press 1978

Hegarty MP, Court RD, Thorne Peggy M

The determination of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine in
biological material

Aust J Agric Res 15, 168-179, 1964a

Hegarty MP, Schinckel PG, Court RD

Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth,
and its toxic principle mimosine

Aust J Agric Res 15, 153-167, 1964b

Hegarty MP, Court RD, Christie GS, Lee CP

Mimosine in *Leucaena leucocephala* is metabolised to a
goitrogen in ruminants

Aust Vet J 52, 490, 1976

Hegarty MP, Lee CP, Christie GS, De Munk FG, Court RD

Comparative toxicities of mimosine and some chemically related
compounds to mouse bone marrow cells in liquid culture

Aust J Biol Sci 31, 115-121, 1978

Hegarty MP, Lee CP, Christie GS, Court RD, Haydock KP

The goitrogen 3-hydroxy-4(1H)-pyridone, a ruminal metabolite
from *Leucaena leucocephala*: effects in mice and rats

Aust J Biol Sci 32, 27-40, 1979

Henschler D

Schwermetalle

In: Forth W, Henschler D, Rummel W Herausgeber

Pharmakologie und Toxikologie, 5te Aufl

Mannheim: BI Wissenschaftsverlag 1987

Holmes JHG

Toxicity of *Leucaena leucocephala* for steers in the wet
tropics

Trop Anim Hlth Prod 13, 94-100, 1981

Holmes JHG, Humphrey EA, Walton EA, O'Shea JD
Cataracts, goitre and infertility in cattle grazed on an
exclusive diet of *Leucaena leucocephala*
Aust Vet J 57, 257-261, 1981

Hylin JW
Toxic peptides and amino acids in foods and feeds
J Agric Food Chem 17, 492-496, 1969

Jander G, Blasius E
Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen
Chemie, 10te Aufl
Stuttgart: S. Hirzel Verlag 1976

Jones RJ
Does ruminal metabolism of mimosine explain the absence
of *Leucaena* toxicity in Hawaii?
Aust Vet J 57, 55-56, 1981

Jones RJ, Hegarty MP
The effect of different proportions of *Leucaena leucocephala*
in the diet of cattle on growth, feed intake, thyroid function
and urinary excretion of 3-hydroxy-4(1H)-pyridone
Aust J Agric Res 35, 317-325, 1984

Jones RJ, Hutton EM; zitiert nach Szyszka et al 1984a
Tropical Crops and Pastures Division of CSIRO 1975/76, 46-47

Jones RJ, Jones RM
Agronomy of *Leucaena leucocephala*
CSIRO information service, sheet no. 41-1, 1979

Jones RJ, Lowry JB
Australian goats detoxify the goitrogen 3-hydroxy-4(1H)-pyridone
(DHP) after rumen infusion from an Indonesian goat
Experientia 40, 1435-1436, 1984

Jones RJ, Megarrity RG
Contrasting responses of goats fed *Leucaena* in Australia
and Hawaii
Leucaena Res Rep 2, 15, 1981

Jones RJ, Blunt CG, Nurnberg GI
The effect of iodine and mineral supplement on penned steers
fed a sole diet of *Leucaena*
Aust Vet J 54, 387-392, 1978

Kirchgeßner M
Tierernährung, 6te Aufl
Frankfurt (Main): DLG-Verlag 1985

Kratzer FH, Vohra P
Chelates in nutrition, 1st ed
Boca Raton: CRC Press 1986

Kreuzer F
Untersuchung von Enfluran auf radikalbildende Eigenschaften
in vivo
München: Med vet Diss 1982

Lieberman M, Hochstein P
Ethylene formation in liver microsomes
Science 152, 213-214, 1966

Lieberman M, Mapson LW
Genesis and Biogenesis of ethylene
Nature 204, 343-345, 1964

Lin JW, Ling KH
Studies on free amino acids of *Leucaena glauca* Benth
III. Biological studies on mimosine
J Formosan Med Ass 60, 657-664, 1961

Lin JY, Shih YM, Ling KH
Studies on the mechanism of toxicity of mimosine
I. Studies of the reaction of mimosine and pyridoxal
phosphate using the spectrophotometric method
J Formosan Med Ass 61, 997-1003, 1962

Lin JY, Shih YM, Ling KH
Studies on the mechanism of toxicity of mimosine. II. Effect of
mimosine on the activity of glutamic-aspartic transaminase in
vitro
J Formosan Med Ass 61, 1004-1010, 1962a

Lin JY, Kuang TL, Ling KH
Studies on the mechanism of toxicity of mimosine. I. The effect
of mimosine on the activity of L-Dopa decarboxylase, in vitro
J Formosan Med Ass 62, 587-592, 1963

Lin JK, Ling TA, Tung TC
Biochemical study of mimosine. II. Comparative study on the
interaction of mimosine and other amino acids with
pyridoxal-5-phosphate in vitro
J Formosan Med Ass 64, 265-272, 1965

Lindner E
Toxikologie der Nahrungsmittel, 3te Aufl
Stuttgart: Thieme Verlag 1986

Little DA, Hamilton RI
Leucaena leucocephala and thyroid function of newborn lambs
Aust Vet J 47, 457, 1971

Lowry JB
Leucaena research at BPT
Leucaena Res Rep 2, 31-32, 1981

Lowry JB, Tangendjaja M, Tangendjaja B
Autolysis of mimosine to 3-hydroxy-4(1H)pyridone in green
tissues of *Leucaena leucocephala*
J Sci Food Agric 34, 529-533, 1983

Lowry JB, Cook N, Wilson RD
Flavonol glycoside distribution in cultivars and hybrids
of *Leucaena leucocephala*
J Sci Food Agric 35, 401-407, 1984

Ludwig O
Untersuchungen zur Mimosinverträglichkeit beim Kaninchen -
Bestimmung der LD₅₀
Göttingen: Diplomarbeit am Institut für Tierphysiologie und
Tierernährung der Universität 1981

Lyon CK
Degradation of mimosine during ensiling of *Leucaena*
J Sci Food Agric 36, 936-940, 1985

Männer K, Bronsch K
Mineralstoffe
In: Scheunert A, Trautmann A Herausgeber
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7te Aufl
Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag 1987

Malmquist FA
The qualitative detection of the amino acids of the Koa Haole
plant
University of Hawaii: Masters Diss 1950

Martell AE, Calvin M
Die Chemie der Metallchelate-Verbindungen
Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1958

Mason RP
Free-radical intermediates in the metabolism of toxic
chemicals
Free radicals in biology V
New York: Academic Press 1982

Matsumoto H, Sherman GD
A rapid colorimetric method for the determination of mimosine
Arch Biochem Biophys 33, 195-200, 1951

Matsumoto H, Smith EG, Sherman GD
The effect of elevated temperatures on the mimosine content
and toxicity of Koa Haole (*Leucaena glauca*)
Arch Biochem Biophys 33, 201-211, 1951

McCay PB

Physiological significance of lipid peroxidation

Fed Proc 40(2), 173, 1981

Mead JF

Free radical mechanisms of lipid damage and consequences
for cellular membranes

In: Pryor WA ed

Free radicals in biology I

New York: Academic Press 1976

Megarritty RG

An automated colorimetric method for mimosine in *Leucaena*
leaves

J Sci Food Agric 29, 182-186, 1978

Meister A

Metabolism and function of glutathione: an overview

Biochem Soc Transact 10, 78-79, 1982

Mitchell JR, Smith CV, Lauterburg BH, Hughes H, Corcoran GB,
Hornig EC

Reactive Metabolites and the Pathophysiology of Acute Lethal
Cell Injury

In: Mitchell JR, Horning Marjorie G eds

Drug Metabolism and Drug Toxicity

New York: Raven Press 1984

Montagna W, Yun JS

The effects of the seeds of *Leucaena glauca* on the hair
follicles of the mouse

J Invest Dermatol 40, 325-330, 1963

Mostad A, Rønning C, Rosenqvist E

The structure of L-mimosine, an L-DOPA analogue

Acta Chem Scand 27, 164-176, 1973

Mostad A, Rosenqvist E, Rønning C

The crystal structure of L-mimosine sulphate hydrate

Acta Chem Scand 28, 249-259, 1974

Myers jr LS

Free radical damage of nucleic acids and their components
by ionizing radiation

Fed Proc 32(8), 1882-1894, 1973

Orrenius S, Moldéus P

The multiple roles of glutathione in drug metabolism

TIPS 5, 432-435, 1984

Osweller GD, Carson TL, Buck WB, van Gelder GA
Clinical and diagnostic veterinary toxicology, 3rd ed
Dubuque: Kendall/Hunt 1985

Owen LN

Hair loss and other toxic effects of *Leucaena glauca* ("Jumbey")
Vet Rec 70(22), 454-457, 1958

Payawan PA

RP intensifies leucaena research
leucaena forum 1(1), 1980

Pryor WA

The role of free radical reactions in biological systems
In: Pryor WA ed
Free radicals in biology I
New York: Academic Press 1976

Reis PJ, Tunks DA, Hegarty MP

Fate of mimosine administered orally to sheep and its
effectiveness as a defleecing agent
Aust J Biol Sci 28(5/6), 495-501, 1975

Reis RJ, Tunks DA, Downes AM

Mimosine, administered orally, and two related compounds
as chemical defleecing agents for sheep
Aust J Agric Res 29, 1065-1075, 1978

Reisner AH, Bucholtz CA, Ward KA

Effects of the plant amino acid mimosine on cell division,
DNA, RNA and protein syntheses in *Paramecium*
Molec Pharmacol 16, 278-286, 1979

Reynolds ES, Moslen Mary T

Free-radical damage in liver
In: Pryor WA ed
Free radicals in biology IV
New York: Academic Press 1980

Riely CA, Cohen G, Lieberman M

Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation
Science 183, 208-210, 1974

Rosas, Hermel, Quintero SO, Gómez J

Mimosine disappearance in arboreous *Leucaena* silage
Leucaena Newsletter 1, 17, 1980

Rosas, Hermel, Quintero SO, Gómez J

Nutrient evaluation of the arboreous legume *Leucaena* in Panama
Leucaena Newsletter 1, 18, 1980a

Ross E, Springhall JA

Evaluation of ferrous sulphate as a detoxifying agent for mimosine in *Leucaena glauca* rations for chickens
Aust Vet J 39, 394-397, 1963

Ruskin FR ed

Leucaena: promising forage and tree crop for the tropics
Washington DC 20418: Nat Acad Sci 1977, p 1-66

Sallmann LV, Grimes P, Collins E

Mimosine cataract

Am J Ophthalmol 47(II), 107-117, 1959

Schmid A

Persönliche Mitteilung 1984

Schmid A

Unveröffentlichte Versuchsergebnisse 1986

Schmid A, Christoph M

Untersuchungen zur Genese der parenteralen Eisenvergiftung
Der prakt Tierarzt 61, 589-595, 1980

Schmid A, Beuter W, Friedrich A

Lipidperoxidation durch Schwermetalle
Wien Tierärztl Wschr 70, 77-81, 1983

Shiroma S, Akashi A

Degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala* de Wit
by goat rumen microorganisms

Jap J Zootech Sci 47(12), 739-747, 1976

Sies H, Akerbom TPM, Cadenas E

The role of glutathione in hepatic hydroperoxide metabolism
Biochem Soc Transact 10, 79-80, 1982

Slater TF

Free radical mechanisms in tissue injury, 1st ed
London: Pion 1972

Smith IK, Fowden L

A study of mimosine toxicity in plants
J Exp Bot 17(53), 750-761, 1966

Spenser ID, Notation AD

A synthesis of mimosine

Can J Chem 40, 1374-1378, 1962

Stand Frieda, Rosoff Betty, Williams GL, Spencer Herta

Tissue distribution studies of ionic and chelated Zn^{65} in mice
J Pharmacol Exp Ther 138, 399-404, 1962

Stecher PG, Finkel MJ, Siegmund OH, Szafranski BM
The Merck Index, 7th ed
Rahway: Merck & Co 1960

Szyszk M

Untersuchungen zum Einsatz von *Leucaena leucocephala* in der Tierernährung unter besonderer Berücksichtigung des toxischen Inhaltsstoffes Mimosin
Göttingen: Diplomarbeit am Institut für Tierphysiologie und Tierernährung der Universität 1980

Szyszk M, ter Meulen U

Der Einsatz von *Leucaena leucocephala* in der Geflügelernährung -
Der "acceptable daily intake" für Mimosin bei Mastgeflügel
Arch Geflügelk 48(5), 177-180, 1984a

Szyszk M, ter Meulen U

Akute Vergiftungserscheinungen bei Schafen verursacht durch die Aminosäure Mimosin
Der Tropenlandwirt 85. Jhg, 59-65, 1984b

Szyszk M, ter Meulen U

Die Bestimmung der biologischen Halbwertszeit für Mimosin an Ratten
Dtsch tierärztl Wschr 91, 262-264, 1984c

Szyszk M, ter Meulen U

Der "acceptable daily intake" für Mimosin bei landwirtschaftlichen Nutztieren und seine Bedeutung für die Einsetzbarkeit von *Leucaena leucocephala* in der Tierernährung
Dtsch tierärztl Wschr 91, 260-262, 1984d

Szyszk M, ter Meulen U

Das Verhalten von Schafen gegenüber dem toxischen Mimosin in *Leucaena leucocephala*
Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 53, 65-69, 1985

Szyszk M, Cheva-Isarakul B, ter Meulen U

Die Mimosinverträglichkeit von thailändischen Ziegen
Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 52, 244-248, 1984a

Szyszk M, Potikanond N, ter Meulen U

Leucaena leucocephala in der Rinderfütterung -
Der "acceptable daily intake" für Mimosin bei Rindern
Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 52, 248-254, 1984b

Szyszk M, Posri S, ter Meulen U

Die Bestimmung des "acceptable daily intake" für Mimosin bei Kaninchen
Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 54, 156-161, 1985

Sykes P

Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie, 7te Aufl
Weinheim: Verlag Chemie 1976

Tang SY, Ling KH

The inhibitory effect of mimosine on collagen synthesis
Toxicon 13, 339-342, 1975

Tangendjaja B, Wills RBH

Analysis of mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone by high-performance liquid chromatography
J Chromatogr 202, 317-318, 1980

Tangendjaja B, Hogan JP, Wills RBH

Degradation of mimosine by rumen contents: effects of feed composition and Leucaena substrates
Aust J Agric Res 34, 289-293, 1983

Tangendjaja B, Lowry JB, Wills RBH

Optimisation of conditions for the degradation of mimosine in Leucaena leucocephala leaf
J Sci Food Agric 35, 613-616, 1984

Tappel AL

Lipid peroxidation damage to cell components
Fed Proc 32(8), 1870-1874, 1973

Tappel AL, Dillard Cora J

In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E
Fed Proc 40(2), 174-178, 1981

Tempel KH

Radiologie für Veterinärmediziner
Stuttgart: Enke Verlag 1983

ter Meulen U, El-Harith EA; zitiert nach ter Meulen und El-Harith 1985

Unveröffentlicht 1981

ter Meulen U, El-Harith EA

Einsatz ungenutzter Ressourcen für die Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere am tropischen und subtropischen Standort
Der Tropenlandwirt 19, 50-67, 1983

ter Meulen U, El-Harith EA

Mimosine - a factor limiting the use of Leucaena leucocephala as an animal feed
Der Tropenlandwirt 86. Jhg, 109-127, 1985

ter Meulen U, Struck S, Schulke E, El-Harith EA
A review on the nutritive value and toxic aspects of
Leucaena leucocephala
Trop Anim Prod 4, 113-126, 1979

ter Meulen U, Günther KD, El-Harith EA
Metabolic effects of mimosine on tyrosine in the rat
Z Tierphysiol, Tierernährg u Futtermittelkde 46, 264-269, 1981

ter Meulen U, Pucher F, Szyszk M, El-Harith EA
Effects of administration of *Leucaena* meal on growth performance of, and mimosine accumulation in, growing chicks
Arch Geflügelk 48(2), 41-44, 1984

Thompson JF, Morris CL, Smith IK
New naturally occurring amino acids
Ann Rev Biochem 38, 137-158, 1969

Tietze F
Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione
Analyt Biochem 27, 502-522, 1969

Tsai KC
The effect of mimosine on the several enzymes
J Formosan Med Ass 60, 58-64, 1961

Tsai WC, Ling KH
Toxic action of mimosine - I. Inhibition of mitosis and DNA synthesis of H.Ep-2 cell by mimosine and 3,4-dihydroxypyridine
Toxicol 9, 241-247, 1971

Tsai WC, Ling KH
Study on the stability constants of some metal ion chelates of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine
J Chin Biochem Soc 2, 70-86, 1973

Tsai WC, Ling KH
Effect of metals on the absorption and excretion of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine in rat in vivo
J Formosan Med Ass 73, 543-549, 1974

Underwood EJ
Trace elements in animal and human nutrition, 4th ed
New York: Academic Press 1977

Unterhalt B
Toxische Aminosäuren und Proteine in Pflanzen
Dtsch Apoth Z 120. Jhg Nr 24, 1093-1094, 1980

Wang HH, Chen SC, Chuang HL, Lin TK, Liang CY, Yang TH
Isolation and utilization of economic soil microbes IX
Microbial decomposition of mimosine
Chem Abstr 65, 11295, 1966

Ward KA, Harris RLN
Inhibition of wool follicle DNA synthesis by mimosine and
related 4(1H)-pyridones
Aust J Biol Sci 29, 189-196, 1976

Wayman O, Iwanaga II, Hugh WI
Fetal resorption in swine caused by *Leucaena leucocephala*
(Lam.) de Wit. in the diet
J Anim Sci 30, 583-588, 1970

Wills RBH, Tangendjaja B
Effect of pH and temperature on the degradation of mimosine
and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone
Phytochem 20(8), 2017-2018, 1981

Windholz Martha, Budavari Susan, Blumetti Rosemary F,
Otterbein Elizabeth S
The Merck Index, 10th ed
Rahway: Merck & Co 1983

Wirth W, Gloxhuber C
Toxikologie, 4te Aufl
Stuttgart: Thieme Verlag 1985

Yoshida Ruth K
A chemical and physiological study of the nature and properties
of the toxic principle in *Leucaena glauca* (Koa Haoile)
Univ Minnesota: Ph.D. Thesis 1944

Younes M, Siegers CP
Lipid peroxidation as a consequence of glutathione depletion
in rat and mouse liver
Res Commun Chem Pathol Pharmacol 27(1), 119-128, 1980

Zimmermann R
Radikalbildung im tierischen Organismus und deren patho-
genetischen Bedeutung
Der prakt Tierarzt 63, 770-778, 1982

Herrn Prof. Dr. R. Schulz danke ich verbindlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Institut sowie eine kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Meinem Vater, Herrn Prof. Dr. A. Schmid, danke ich herzlich für viele Anregungen, Diskussionen und Rat-schläge bei der Anfertigung der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Barbara Ferlings für technische Hilfe bei der Niederschrift der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 30. Oktober 1958 wurde ich, Helmut Schmid, als zweiter Sohn von Dr. Albrecht Schmid und Dr. Dietlinde Schmid geb. Jakobs in München geboren.

Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in Solingen und später in München.

Dann wechselte ich auf das neusprachliche Klenze-Gymnasium und mit Verlegung des dortigen neusprachlichen Zweiges auf das Dante-Gymnasium in München, wo mir 1978 die Allgemeine Hochschulreife zuerkannt wurde.

Ab Wintersemester 1978/79 studierte ich Chemie an der Technischen Universität München, ab Sommersemester 1980 Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen und ab Wintersemester 1980/81 Tiermedizin an der Ludwig - Maximilians-Universität München, wo ich 1985 die Tierärztliche Prüfung ablegte.

Im Jahre 1986 wurde mir vom Bayerischen Staatsministerium des Inneren die Approbation als Tierarzt erteilt.

Die vorliegende Dissertation habe ich vom Sommersemester 1986 bis zum Wintersemester 1987/88 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

